

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
ARSTITEADUSKOND
FÜSIOLOOGIA INSTITUUT

Sirli Heinsoo

WFS1 geeni uurimine seoses skisofreeniaga

Magistritöö

Juhendaja Kati Koido, Ph.D.

Kaasjuhendajad: Anu Tammiste, M.Sc.

Prof. Andres Metspalu, M.D., Ph.D.

TARTU

2013

Sisukord

Sisukord.....	2
Kasutatud lühendid ja mõisted	4
Sissejuhatus	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1 Skisofreenia	7
1.1.1 Skisofreenia sümptomid.....	8
1.1.2 Skisofreenia tüübid	10
1.1.3 Skisofreenia epidemioloogia.....	12
1.1.4 Skisofreenia geneetilised uuringud	13
1.2 Wolframi sündroom.....	15
1.2.1 Wolframiini geen ja valk	16
1.2.2 WFS1 geeni mutatsioonid seoses skisofreeniaga	19
Töö eesmärk	21
2. EKSPERIMENTAALNE OSA.....	22
2.1 Materjal.....	22
2.1.1 DNA proovid	22
2.2 Metoodika.....	24
2.2.1 Vere kogumine ja säilitamine	24
2.2.2 Alleelspetsiifiline PCR.....	24
2.2.3 Produktide puhastamine	25
2.2.4 DNA puhtuse ja kvaliteedi analüüs.....	26
2.2.5 Sekveneerimise PCR.....	26
2.2.6 Sadestamine	27
2.3 Andmete statistiline analüüs	28
3. TULEMUSED JA ARUTELU.....	30
3.1 Tulemused	30
3.1.1 Assotsiatsioonianalüüs.....	30
3.1.2 LD-analüüs.....	32
3.1.3 Haplotüübianalüüs	34
3.2 Arutelu	36
Kokkuvõte	39

Research of WFS1 gene and schizophrenia	40
Tänuavaldused.....	41
Kasutatud kirjandus	42
Kasutatud veebiaadressid	47
Kasutatud raamatud.....	48

Kasutatud lühendid ja mõisted

α	<i>significance level</i> , olulisuse nivoo
APA	<i>American Psychiatric Association</i> , Ameerika Psühhiaatriaselts
ATF6 α	<i>activating transcription factor 6</i> , aktiivne transkriptsioonifaktor 6
ATP1B1	ATPaasi β -1 subühik
bp	aluspaar
CI	<i>confidence interval</i> , usaldusväarsuse intervall
CNV	<i>copy number variant</i> , koopiaarvu variatsioon
DI	<i>diabetes insipidus</i> , magediabeet
DIDMOAD	<i>diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy and deafness</i> , magediabeet, insuliin-puudulik diabeet, nägemisnärv atroofia ja kurtus
DM	<i>diabetes mellitus</i> , insuliin-puudulik diabeet
DSM-IV	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 4th edition</i> , Vaimsete Haiguste Diagnostiline ja Statistiline juhend 4. väljaanne
ER	<i>endoplasmatic reticulum</i> , endoplasmaatiline retiikulum
GWAS	<i>genome-wide association studies</i> , ülegenoomsed assotsiatsiooniuuringud
ICD-10	<i>International Classification of Diseases 10th edition</i> , Rahvusvaheline Haiguste Klassifikatsioon 10. väljaanne
Kb	tuhat aluspaari
kDa	tuhat daltonit
LD	<i>linkage disequilibrium</i> , ahelduse tasakaalustamatus
MRI	<i>magnetic resonance imaging</i> , magnetresonantstomograafia
OA	<i>optic atrophy</i> , nägemisnärv atroofia
OD	<i>optical density</i> , optiline tihedus
OR	<i>odds ratio</i> , riskifaktor
p	kromosoomi lühike õlg
P-väärtus	<i>significance probability</i> , olulisustõenäosus
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , polümeraasi ahelreaktsioon
q	kromosoomi pikk õlg
SCID	<i>Structured Clinical Interview for DSM Disorders</i> , kindla struktuuriga kliiniline intervjuu DSM häirete diagnoosimiseks

SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i> , ühenukleotiidne polümorfism
TF	<i>transcription factor</i> , transkriptsiooni faktor
WFS1	wolframin 1 geen
WFS2	wolframin 2 geen
WHO	<i>World Health Organisation</i> , Maaailma Tervishoiuorganisatsioon
WS	<i>Wolfram syndrome</i> , Wolframi sündroom

Sissejuhatus

Skisofreenia on psüühikahäire, mille enamlevinud sümptomid väljenduvad häiretena tajumises, mõtlemises ning tunde- ja tahteelus. Sümptomite põhjal on skisofreenia jaotatud erinevateks haigusmudeli tüüpideks. Skisofreenia on üks tõsisemaid inimkonda ohustavaid haigusi, mille rohkeid etioloogilisi tegureid veel ei tunta. Kuna tegemist on komplekshaigusega, siis võivad keskkonnast tingitud tegurite kõrval haiguse teket mõjutada ka geneetilised tegurid. Tänapäeval on teada, et tegemist on väga polügeense ja erinevate geneetiliste variatsioonidega haigusega, mille geneetiline päritavus ulatub 80%-ni.

Wolframi sündroom on haruldane autosomaalne retsessiivselt päritav neurodegeneratiivne haigus, mille peamiseks sümptomiteks on noorena esinev magediabeet, insuliin-puudulik diabeet, nägemisnärvi atroofia ja kurtus ehk teise nimetusega DIDMOAD (*diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy and deafness*). Wolframi sündroomi põhjustavad erinevad geneetilised muutused WFS1 geenis. Samal ajal on korduvalt täheldatud geenmutatsiooni võimalikel kandjatel ka suuremat riski haigestuda erinevatesse psühhiaatrilistesse haigustesse. Sellega seoses on ka antud töös võetud lähema uurimise alla WFS1 geenis esinevad polümorfismid, et uurida võimalikke seoseid skisofreenia tekkega. Käesolev töö on osa koostööprojektist TÜ füsioloogia instituudi ja TÜ psühhiaatriakliinikuga.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Skisofreenia

Skisofreenia on psühhiaatiline sündroom, mille levimus on 4/1000-st ning suremusrisk 7,2/1000-st inimesest (Saha, jt., 2005). Haiguse geneetiline päritavus ulatub 80%-ni (Cardno ja Gottesman, 2000; Sullivan, jt., 2003) ning seetõttu on skisofreeniat kui geneetilist haigust ulatuslikult uuritud. Tänapäeval on teada, et haigus on väga polügeenne ning väga erinevate geneetiliste variatsioonidega (Kim, jt., 2011). Kõrge päritavuse protsent ei tulene ainult geneetilistest mõjutustest, vaid skisofreeniat käsitletakse kui komplekshaigust, mis on põhjustatud geneetiliste ja keskkonna faktorite interaktsioonist ja mõjust (van Os ja Kapur, 2009).

Skisofreenia mõiste võttis esimesena kasutusele Eugen Bleuler 1911. aastal. Tema eesmärgiks oli algselt erinevate haigustena käsitletud mõtlemise häired, hallutsinatsioonid ja luulumõtted liigitada ühe haiguse alla, kuna vaadeldud sümptomid esinesid paljudel juhtudel koos (Bleuler, 1988).

Tänapäeval on skisofreenia enamasti noores täiskasvanueas algav raske, psühhootilise hulka klassifitseeritud psüühikahäire (Insel, 2010). See on üks tõsisemaid ja komplitseeritumaid inimkonda ohustavaid haigusi, mille rohkeid etioloogilisi tegureid veel küllaldaselt ei tunta (Murray ja Lopez, 1996). Skisofreenia haigusepisood algab järsku või kujuneb järk-järgult. Haiguse diagnoosimine eeldab vähemalt ühe- kuni kuuekuulist (olenevalt klassifikatsioonist) kestust ja äge staadium ühe kuu pikkust haigusnähtudega perioodi (van Os ja Kapur, 2009). Skisofreenia mõjutab kognitiiv-käitumuslikke ja emotsionaalseid funktsioone. Paljude patsientide sümptomid muutuvad elu jooksul ning suuremal osal patsientidest esineb haigusnähte hulk aastaid või ka aastakümneid. Kui skisofreeniasse haigestutakse lapsepõlves või noorukina, ei saavuta patsient enamasti skisofreeniat mittepõdevatele indiviididele omast tegutsemistaset. Paremal juhul võib skisofreeniast ka paraneda, kuid halvemal juhul võib haigus muutuda krooniliseks (Insel, 2010).

Morfoloogiliselt käsitletakse skisofreeniat kui aju arengu varajast häiret. Raseduse II trimestril liiguvad närvirakud geneetiliselt programmeeritud migratsiooni teel periventrikulaarsest

piirkonnast ajukoore suunas (Khashan, jt., 2008). Haigetel esinevad häired närvirakkude kihilises struktuuris. Välimiste rakukihtide neuronite tihedus võrreldes tervetega on väiksem ning sügavamates kihtides suurem. Mõned uusimad etioloogilised hüpoteesid seostavad skisofreenia tekkimist protsessiga, mille käigus aju areng, ajupoolkerade asümmeetria ning diferentseerumine võimaldavad erikäelisuse, kõne- ja keelefunktsioonide väljakujunemist (Vita, jt., 2006; Ellison-Wright ja Bullmore, 2009; Glahn, jt., 2008).

Skisofreenia põhjuseid täpselt veel ei tunta, kuid arvatakse, et need võivad olla väga erinevad ja koosneda paljudest teguritest. Haiguse tekkega seoses on erilist tähelepanu pööratud geneetilistele ja keskkonnast tingitud teguritele ning nende koostoimimisele. Kliinilist tähtsust omab skisofreenia esinemine lähisugulastel, skisotüüpne isiksus, rasedus- või sünnitustüsistus. Teoreetilist tähtsust omavad kesknärvisüsteemi haigused, kohmakus, aeglane areng, madal intelligentsustase ja õppimisraskused (van Os ja Kapur, 2009; Insel, 2010).

Euroopas ja Ameerikas on aastate jooksul väljatöötatud kaks peamist juhendit, mille järgi skisofreeniat diagnoositakse ning mille sisuline pool on väga sarnane. Euroopas on levinud Maailma Tervishoiuorganisatsiooni (*World Health Organisation – WHO*) poolt väljaantud Rahvusvaheline Haiguste Klassifikatsiooni 10. väljaanne (*International Classification of Diseases 10th edition – ICD-10*), mille viiendas osas käsitletakse psüühika- ja käitumishäireid. Ameerikas on levinud Ameerika Psühhiaatriaseltsi (*American Psychiatric Association – APA*) poolt väljaantud Vaimsete Haiguste Diagnostiline ja Statistiline juhendi 4. väljaanne (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 4th edition – DSM-IV*).

1.1.1 Skisofreenia sümptomid

Skisofreenia kliinilised sümptomid erinevad noorukite ja täiskasvanute puhul. Haigele noorukile on iseloomulikud mõtlemishäired, nagu seosetus ja omapärased assotsiatsioonid, ning hallutsinatsioonid ja motoorikahäired. Sageli võivad esineda ka paranoilisus ja kuulmishallutsinatsioonid. Esineda võib meeleolu kõikumist, rahutust, tahtmatuid või stereotüüpseid liigutusi ja sotsiaalset abitust. Teadvus jääb tavaliselt selgeks ja vaimsed võimed säilivad, kuigi aja jooksul võivad kujuneda teatud puudujäägid teabe käsitlemisel. Luulumõtete esinemine ei ole tüüpiline kõikidele haigetele ning nende intensiivsus võib

haiguse erinevatel arenguetappidel olla vahelduv. Nutt, naer, viha ja muud tugevad emotsioonid võivad vahelduda kiiresti, ilma et need oleksid seotud teiste psüühiliste protsesside või väliste sündmustega. Skisofreenia korral pole siiani esinenud ühtegi sümptomit, mis esineks 100%-lt kõikidel haigetel (van Os ja Kapur, 2009; Tandon, jt., 2009).

Traditsiooniliselt on skisofreenia sümptomeid jagatud positiivseteks ehk „produktiivseteks“ sümptomiteks, mille all mõistetakse normaalsete psüühiliste funktsioonide häirumist ja negatiivseteks sümptomiteks, mis tähendavad normaalsete psüühiliste funktsioonide nõrgenemist või lausa puudumist. Tabel 1 annab lühiülevaate tänaseks väljatöötatud sümptomite gruppidest ja nende iseloomulikest tunnustest (van Os ja Kapur, 2009; Tandon, jt., 2009).

Tabel 1. Skisofreenia sümptomite gruppide iseloomustus (van Os ja Kapur, 2009; Tandon, jt., 2009).

Sümptomite grupid	Iseloomustus
Positiivsed	Hallutsinatsioonid; luululised ning mõtlemise häired; avatuse või kontrolli mõtted; organiseerimatu, luululine ja veider käitumine; erutus- ja rahutusseisundid; keelelised ja kommunikatsiooni häired
Negatiivsed	Normaalse psüühika funktsioneerimine on alanenud või lakanud; huvide ja elurõõmu kadumine; alanenud tähelepanu; emotsionaalne lamedus, tuimenemine ja tahtetus; kõne ja mõtlemise vaegus; sotsiaalne isoleerumine
Afektiivsed	Alanenud meeleolu; tujutus, ärritatus ja üksindustunne; pidev ärevus ja süütunded; mure ja pinge
Kognitiivsed	Infotöötluste ja tähelepanuhäired; töö- ja õppimisvõime langus; mäluhäired ja assotsiatsioonide puudulikkus; häirunud spontaanse kõne produtseerimine
Agressiivsed	Vägivaldsus; teiste ja enesevigastamise oht; vara kahjustamine ning impulsi kontrollihäired

Skisofreenia haiguskulg võib olla pidev või perioodiline. Haigus võib avalduda ägeda psühhoosina või ilmned a vähehaaval, mistõttu on viimasel juhul haigust raske avastada. Samuti võib skisofreenia esineda ühe või mitme haigusepisoodina, millest patsient osaliselt või täielikult paraneb. Haigusperioodi kuulub aktiivne järk, mil esinevad positiivsed sümptomid, kuid võib ilmned ka negatiivsed sümptomid. Lisaks aktiivsele perioodile võib haigusjärku kuuluda ka eel- ja jääknähtude etapp. Sel ajal avalduvad häired enamasti

negatiivsete sümptomitena, kuid mõnikord ka vaibunud positiivsete nähtudena (Tandon, jt., 2009).

1.1.2 Skisofreenia tüübid

Mõistmaks paremini skisofreeniat, kui väga erinevate tunnustega haigust, on tänaseks kõige enam koosinenud sümptomite järgi välja kujunenud erinevad skisofreenia tüübid. Käesolevas magistritöös käsitletakse lähemalt paranoidset, hebefreenset, katatoonset, residuaalset, diferentseerumata, lihtsat, skisotüüpset ja skisoafektiivset skisofreenia tüüpi (Kendler, 1981). Haigusmudeli tüüpidele on omased sümptomid, mis ei pruugi alati patsientidel esineda. Sellele vaatamata püütakse kõikidel patsientidel skisofreenia diagnoosimisel ära määrata kõige ligilähedasem tüüp.

Paranoidne skisofreenia on üks enamlevinum skisofreenia vorm. Kõige sagedasemad sümptomid on püsivad paranoilised luulumõtted. Tihti kaasnevad ka hallutsinatsioonid ja tajuhäired. Paranoidse tüübi sümptomiteks loetakse ka jälitamise ja suhtumise luulumõtteid, ähvardavaid kuulmishallutsinatsioone ning lõhna- ja maitsehallutsinatsioone. (Weinberger ja Harrison, 2011, 47-53; Lönnqvist ja Heikkinen, 1999, 42-45). Emotsioonid on tavaliselt vähem tuimenenud kui skisofreenia teiste vormide puhul. Haigus kulg võib olla episoodiline või perioodiline ning algus on enamasti hilisem, kui hebefreenne ja katatoonse vormi puhul. Hiljem alanud skisofreenia korral ei mängi pärilikkus või raseduskomplikatsioonid nii olulist rolli, kui vara alanud haiguste puhul.¹

Hebefreenset skisofreeniat juhivad emotsioonide, tahtelu- ja mõttekäiguhäired. Käitumine võib olla ettearvamat, kõne laialivalgus ja seosetu. Samuti võivad esineda inadekvaatsed käitumuslikud reaktsioonid. Emotsioonid väljenduvad sageli itsitamisega või omaette naermisega. Erinevalt paranoidsest tüübist esineb luulumõtteid vähem ning kiiresti ilmneb isoleerumistendents. Hebefreenne tüüp on tavaliselt halva prognoosiga, kuna negatiivsed sümptomid ilmnevad kiiresti. Antud tüübile on iseloomulik suhteliselt varajane esmasepisood, vahel ka enne 20-ndat eluaastat. (Lönnqvist ja Heikkinen, 1999, 42-45)

¹<http://www.kliinikum.ee/psyhhaatriakliinik/lisad/ravi/ph/20psyhhoos.htm>

Katatoonse skisofreenia valdavateks ilminguteks on väljendunud psühhomotoorsed häired. Sundasendid ja –poosid võivad püsida pikka aega. Silmatorkavaks tunnuseks on ägeda motoorse rahutuse episoodid. Katatoonse skisofreenia diagnoosimiseks peab kliinilises pildis domineerima kas alanenud reaktsioon välisärritustele, vähenenud spontaansed liigutused, rahutus, poseerimine, negativisim, rigiidsus või kõne ning tegevuse jälgendamine. Oluline on tõdeda, et katatoonsed nähud võivad tähendada ka ajuhaigust, ainevahetushäiret, depressiooni või alkoholi ja uimastite kasutamist. (Weinberger ja Harrison, 2011, 30-40)

Lihtsa ja skisotüüpse skisofreenia korral ei ole tuvastatud peamist enamlevinud sümptomit ning seetõttu on mõlemad tüübid suhteliselt harva diagnoositavad. Lihtsa skisofreenia puhul võivad aeglaselt progresseeruda negatiivsed sümptomid, kuid siinkohal ei pruugi esineda hallutsinatsioonid või luulumõtteid. Skisotüüpse haiguse puhul peavad diagnoosimiseks kindlasti esinema vähemalt neli antud tüübile omast sümptomit. Enamlevinud tunnused on kohatud ja vähesed emotsioonid, sotsiaalne eraldumine, paranoilised mõtted ning juhuslikud mööduvad poolpsühhootilised episoodid. Samuti võib skisotüüpse skisofreenia puhul esineda veidrat käitumist ning tundeelu ja mõtlemise häireid.¹

Skisoafektiivne häire esineb episoodiliselt, kus domineerivad afektiivsed ja skisofreenia sümptomid. Enamasti esinevad sümptomid üheaegselt ning kestavad vähemalt mõne päeva. Skisoafektiivne häire on paigutatud skisofreenia ja meeleoluhäirete vahepeale, kuna esinevad tüüpilised meeleoluhäired koos skisofreenia tüüpiliste sümptomitega. Meeleoluhäiretena võivad esineda näiteks depressiooni, mania või segatüüpi perioodid. (Weinberger ja Harrison, 2011, 30-40)

Viimasena käsitletakse antud uurimistöös residuaalset ja diferentseerimata skisofreeniat, kus diferentseerimata skisofreenia korral esinevad samaaegselt mitmele skisofreenia vormile iseloomulikud tunnused. Residuaalset skisofreeniat loetakse haiguse arengu krooniliseks staadiumiks, kus toimub ilmne üleminek haiguse hilisstaadiumile. Iseloomustavaks on pikema perioodi vältel püsivalt avaldunud negatiivsed sümptomid ja häired.¹

Tänapäevaks kõige enam diagnoositud skisofreenia tüübid on paranoidne ja diferentseerimata skisofreenia nende tüüpide kõige sagedamate sümptomite esinemise tõttu.

1.1.3 Skisofreenia epidemioloogia

Skisofreenia esinemissagedus DSM-IV poolt raporteerituna on 0,5-1% (American Psychiatric Association, 1994). Meestel on täheldatud skisofreenia esmasepisoodi kõige sagedamini 20. – 28. eluaasta vahel ja naistel 24. – 32. eluaasta vahel. See võib osaliselt olla tingitud üle 40-aastaste haigestunud naiste rohkusest. Siinkohal on oluline nentida, et skisofreenia võib alata ka enne 10-ndat või pärast 50-ndat eluaastat (Aleman, jt., 2003). Samal ajal on hilisemad uuringud näidanud, et patsiendi sugu ei mõjuta statistiliselt oluliselt skisofreenia teket (Saha, jt., 2005). Küll on täheldatud paljudes uuringutes mitmete muude elu jooksul indiviidi mõjutavate tegurite osatähtsust skisofreenia tekkele. Näiteks leiti, et skisofreeniasse võivad kergemini haigestuda elukohta migreerunud inividid võrreldes põliselanikega (McGrath, jt., 2008). WHO poolt läbiviidud kümne riigi uuringus näidati, et skisofreeniat on samuti tunduvalt kergem prognoosida arengumaades võrreldes arenenud riikidega, mis tähendab, et arengumaades on sümptomid paremini äratuntavad (Jablensky, jt., 1992; Bresnahan, jt., 2003).

Eestis haigestub skisofreeniasse või teistesse psühhootilistesse häiretesse igal aastal umbes 400 - 450 inimest. Skisofreenia tõttu saab igal aastal ravi 0,025 – 0,05% populatsioonist. Eestis on üle 10 000 skisofreenia haige, kellest statsionaarsel ravil on haiguse ägenemise tõttu umbes 500 - 700 haiget. (Lönqvist ja Heikkinen, 1999, 27)

Eelnevalt mainitud suremusrisk on 7,2/1000-st (Saha, jt., 2005) indiviidist, kuid siinkohal on oluline märkida, et üks sagedasemaid surmapõhjusi skisofreeniahaigetel on suitsiid. Ligikaudu pooled haigetest on teinud vähemalt ühe suitsiidikatse elu jooksul (McGrath, jt., 2008). Skisofreenia on siiski väga raske haigus, mille puhul vaid teatud arvul juhtudest on ravi tulemuseks täielik või osaline tervenemine. Kahjuks on hea prognoosiga haigete osakaal siiski veel suhteliselt väike ning ligi pooltel haigestunutest esineb märkimisväärsed häired kogu elu vältel. Suhteliselt väheste tervenemisjuhtude tõttu on viimase 20 aasta jooksul püütud läheneda haigusele geneetiliselt.

1.1.4 Skisofreenia geneetilised uuringud

Alles mõned aastad tagasi teati skisofreenia geneetilise pildi kohta märkimisväärselt vähe ning enamasti põhineti spekulatsioonidel. Skisofreenia geneetiliste uuringute peamiseks eesmärgiks on olnud arendada täielikku nimekirja geneetilisest lookustest ja radadest, et saada ülevaadet haiguse põhjustest ja võimalikest ravivõimalustest vältimaks haigestumist ja suremust. Põhinedes sellele, kui vähe on teada selle salapärase, kliiniliselt heterogeense ja geneetiliselt kompleksse haiguse kohta, võib iga väiksemgi uuring laiendada arusaama skisofreenia geneetilise pildi kohta.

Skisofreenia uurimiseks on läbi viidud mitmeid erinevaid geneetilisi ja mittegeneetilisi uuringuid. Addington ja kaasautorid (2009) viisid läbi kliinilise järelvalve, kus arstide poolt uuriti patsientide perekonna ajalugu. Uuringu käigus ei teostatud ühtegi DNA-analüüsi ning tulemuseks ei leitud paraku ühegi sugupuu sees selget Mendeli päritavust.

Nelja erineva autori poolt teostati neli sõltumatut uuringut, mille aluseks võeti geneetiline epidemioloogia. Ka nendes uuringutes ei tehtud DNA-analüüse, vaid skisofreeniat diagnoositi erinevas suguluses olevatel patsientidel, näiteks perekonnas erinevatel põlvadel ning samuti kaksikutel ja adopteeritud lastel. Uuringute lõpptulemusena leiti tugevaid, kuid kaudseid tõendeid suguluse ja skisofreenia kõrge päritavuse vahel (Lichtenstein, jt., 2006; Lichtenstein, jt., 2009; Sullivan, 2005; Sullivan, jt., 2003).

Olulise läbimurde tegi Bassett'i töögrupp 2000. aastal, kus patsientidel otsiti genoomi muutuseid tsütogeneetilise uuringu abil. Töö tulemusena leiti haigetel 22. kromosoomi pikast õlast regioonist 11.2 deletsioon, mis osutus haruldaseks riskifaktoriks skisofreeniale. Skisofreenia uurimiseks on läbi viidud ka veel segregatsiooni analüüse (McGuffin ja Huckle, 1990; Wray ja Visscher, 2010), ülegenoomilisi aheldusanalüüse (Ng, jt., 2009) ja kandidaatgeeni assotsiatsiooni analüüse (Collins, jt., 2011; Sanders, jt., 2008), kuid kõikide nende uuringute tulemused ei ole andnud statistiliselt olulist tulemust skisofreenia geneetilise pildi välja töötamiseks.

Viimaste aastate jooksul on haiguse uurimiseks tehtud ka väga palju ülegenoomseid assotsiatsioonianalüüse (*genome-wide association studies* – GWAS) (Athanasu, jt., 2010;

Purcell, jt., 2009; Lencz, jt., 2007; Need, jt., 2009; O'Donovan, jt., 2008; Shi, jt., 2009; Stefansson, jt., 2009; Sullivan, jt., 2008). Pärast GWAS-uuringuid on jõutud arusaamale, et statistiliselt oluliste tulemuste saamiseks tuleb uuringusse kaasta võimalikult suuri uuringugruppe. Samuti on GWAS-metoodika andnud tunduvalt rohkem võimalusi tuntumate geneetiliste variatsioonide identifitseerimiseks.

Skisofreenia uurimisel on samuti väga oluliseks ostunud koopiaarvu variatsioonid (*copy number variants* – CNV). Need on küll väga haruldased, aga omavad potentsiaalset riski skisofreenia tekkele. Genoomis on juba praeguseks tuvastatud mitmeid erinevaid deletsioone ja duplikatsioone (Levinson, jt., 2011). Suured genoomimuutused on mittespetsiifilised ja suurendavad riski mitmesuguste psühhiaatriliste, neuroloogiliste ja teiste sarnaste haiguste tekkimisele (Sebat, jt., 2009).

Nüüdseks on juba tekkinud kogemustel põhinev ja otsene ülevaade skisofreenia geneetilise arhitektuuri kohta. Leitud andmed annavad selgust, et skisofreenia tekkimisele kaasa aitavad geneetilised variatsioonid võivad olla väga sagedased kui ka väga haruldased. Tehtud uuringud annavad selge suuna, kuidas skisofreeniat edasi uurida. Sealhulgas on kõige olulisem võtta võimalikult suur uuringugrupp, et ka kõige haruldasemad geneetilised variatsioonid annaksid statistiliselt olulisi tulemusi. Tehtud uuringutest on veel näha, et kõige suurema tõenäosusega annavad positiivseid ja informatiivseid tulemusi just GWAS- ja sealhulgas ka CNV-uuringud. Kõige uudsemad tehnoloogiad, mille abil täna veel skisofreeniat uuritakse, on ülegenoomi sekveneerimine ning eksoomi sekveneerimise metoodika. Paraku on aga tegemist senini väga kalli analüüsimeetoditega ning tulemusteni, mille põhjal järeldusi teha, jõutakse aeglaselt.

1.2 Wolframi sündroom

Esimesena kirjeldas Wolframi sündroomi (MIM 222300) 1938. aastal dr. D. J. Wolfram, kelle järgi on sündroom ka nime saanud (Wolfram ja Wagener, 1938). Wolframi sündroom (WS) on haruldane autosomaalne retsessiivselt päritav neurodegeneratiivne haigus, mille peamisteks sümptomiteks on noorena esinev magediabeet, insuliin-puudulik diabeet, nägemisnärvi atroofia ja kurtus ehk teise nimetusega DIDMOAD (*diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy and deafness*) (Strom, jt. 1998).

Sündroom on neurodegeneratiivne hõlmates kesknärvisüsteemi, perifeersed närvid ja neuroendokriinse koe. Kui laps või lapsed on haiged ja vanemad terved, siis on tõenäoliselt tegemist retsessiivse pärilikkusega, kus mõlemad vanemad on heterosügootid Wolframi sündroomi suhtes (Fraser ja Gunn, 1977; Gunn, jt., 1976).

Wolframi ja Wageneri uuringutes olid patsientide peamisteks sümptomiteks nooruses tekkiv insuliin-puudulik diabeet (*diabetes mellitus*, DM) ja nägemisnärvi atroofia ehk kõhetumine (*optic atrophy*, OA). Hilisemalt on läbi viidud üle 200 uuringu, kus on WS sündroomiga patsientidel täheldatud ka teisi sagedasti esinevaid sümptomeid (Rigoli, jt., 2011). Ka täna loetakse diagnoosimise minimaalseks kriteeriumiks DM ja OA esinemist (Barrett, jt., 1995). Sensorineuraalne kurtus, väikeaju ataksia, perifeerne neuropaatia, vaimse arengu peetus, psühhiaatrilised haigused ja neerukulgla arengupuuded, nagu tagasihoidmatus ja neuropaatiline uriin, ning muud neuroloogilised ja endokriinsed anomaaliad on lisasümptomid, mida on täheldatud suurel osal WS patsientidest (Rigoli, jt., 2011). Samuti võivad esineda neuropsühhiaatrilisi kõrvalekaldeid nagu dementsus, psühhoos ja afektiivne häire (Kinsley, jt., 1995; Swift, jt., 1990). Eeldatavad geenmutatsiooni kandjad võivad tihti kannatada just psühhiaatriliste haiguste käes (Swift, jt., 1990).

Noorena tekkiv insuliin-puudulik diabeet (DM) on tavaliselt üks esimesi sümptomeid, mis tekib keskmiselt 6 aasta vanuselt ja väljendub väikeste veresoonte komplikatsioonidena. On täheldatud, et see areneb tunduvalt aeglasemalt kui tavaline 1. tüüpi diabeet ning peaaegu kõik patsiendid vajavad insuliinisüste (Ganie ja Bhat, 2009).

Teiseks väga oluliseks sümptomiks on nägemisnärvi atroofia (OA), mis avaldub keskmiselt 11 aasta vanuselt, kuid võib esineda ka vahemikus 6 elukuud kuni 30 eluaastat. Atroofia väljendub vähenenud nägemisteravuses ning värvipimeduses. OA on progressiivne haigus, mis jätab enamuse patsientidest lõpuks pimedaks (Rigoli, jt., 2011).

Osaline kraniaalne magediabeet (*diabetes insipidus*, DI) esineb 73 - 75% patsientidest ning keskmiselt 14 aasta vanuselt, kuid võib ilmned ka vahemikul 3 elukuud kuni 40 eluaastat. DI allub hästi nina kaudu või oralselt annustatud desmopressiinile. Viimane enamlevinud sümptom WS-i puhul on sensoneuraalne kurtus, mis tekib keskmiselt 16 aasta vanuselt, kuid võib esineda ka 5- kuni 39-aastaselt (Rigoli, jt., 2011).

Wolframi sündroomi on uuritud ka morfoloogiliselt, kus magnetresonantstomograafia (*magnetic resonance imaging – MRI*) skaneerimismeetod näitab sündroomi korral üldist aju atroofiat, eriti väikeajus. Samuti on täheldatud tagumise hüpofüüsi signaali puudumist ning signaali vähenemist optilisest närvist (Rigoli, jt., 2011).

WS sagedus on ennustatud 1/770 000 UK-s, kus kandja sagedus on 1/354 (Barrett, jt., 1995). Antud sageduse tase on tunduvalt madalam kui Põhja-Ameerikas, kus 1/100 000 on haige ja 1/100 on kandja (Fraser ja Gunn, 1977). WS patsientide keskmine suremus on 30 aastat, mis on tunduvalt väiksem eluiga võrreldes näiteks keskmise suremusega 1. tüüpi diabeediga patsientidel (Kinsley, jt., 1995). WS patsiendid surevad tihti tsentraalse hingamispuudulikkuse tõttu, mis on põhjustatud ajutüve atroofiast (Barrett, jt., 1995).

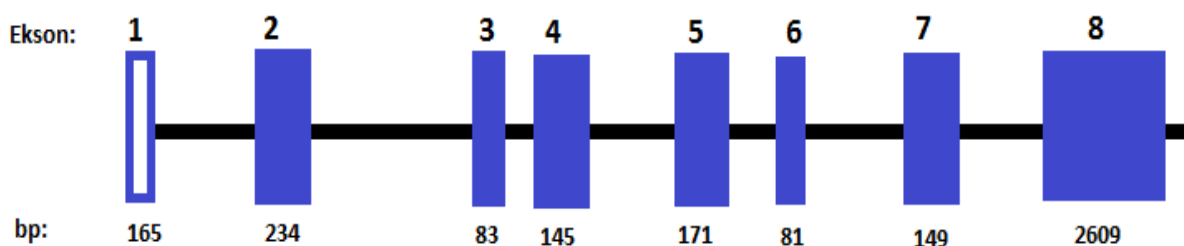
1.2.1 Wolframiini geen ja valk

Mutantne Wolframi sündroomi geen identifitseeriti 1998. aastal geneetilise kaardistamise ja kandidaatgeenide abil kahe sõltumatu töögrupi poolt. Geen sai nimetused WFS1 (Inoue, jt., 1998) ning wolframiin (Strom, jt., 1998).

WFS1/wolframiini geen koosneb keskeltläbi 33,4 kb genoomsest DNA-st ning asub 4. kromosoomi lühikeses õla 16.1 regioonis. Geen koosneb seitsmest väiksemast ja ühest suuremast eksonist, millest 1. ekson on mittekodeeriv ning suurim on 8. ekson (Joonis 1).

Antud uurimustöös uuritakse lähemalt just 8. eksonit, mille kogupikkus on 2609 aluspaari (bp). Sellest pikkusest kodeeriv ala moodustab 1812 bp ja mittekodeeriv 797 bp. Translatsiooni alguspunkt geenis asub 2. eksonis ning WFS1 geen kodeerib 890-aminohappe pikkust wolframiini valku molekulaarmassiga 100 kDa (Hofmann, jt., 2003).

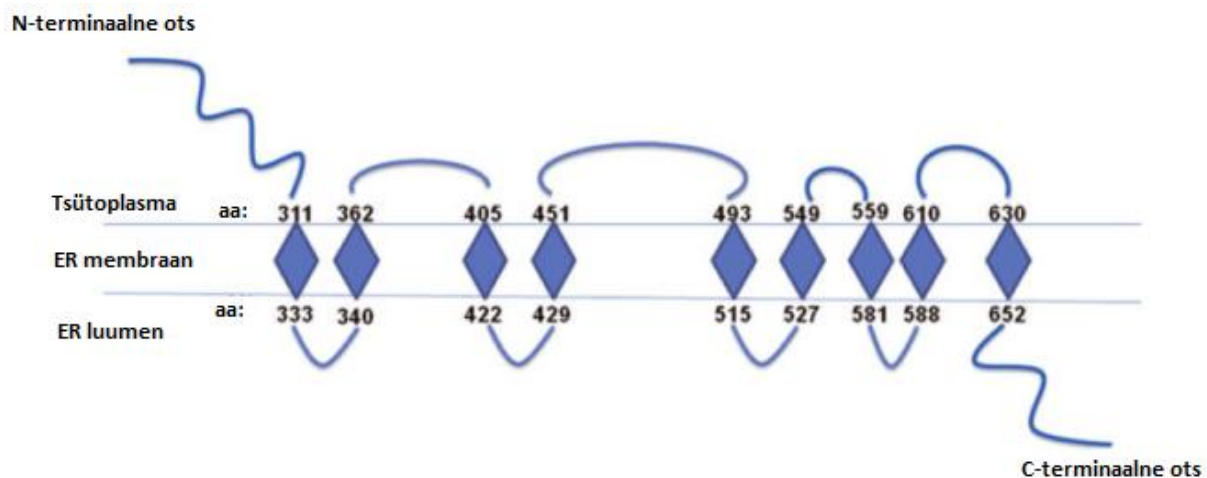
El-Shanti ja teised identifitseerisid 2000. aastal oma uuringus ka potentsiaalse teise lookuse, WFS2 (MIM 604928), mis asub 4. kromosoomi pikema õla 22-24 regioonis. Nad leidsid, et uuringus kasutatud patsientide fenotüüp oli veidi erinev kui WFS1 patsientidel. Nimelt puudus magediabeet haigestunud perekonnaliikmetel ning osadel patsientidel esinesid ülemise seedetrakti sügavad haavandid ja veritsus (El-Shanti, jt., 2000). Kodeeritav valk lokaliseerub endoplasmaatilises retiikulumis, kuid ei interakteeru otseselt wolframiini valguga (Amr, jt., 2007).



Joonis 1. WFS1 geen, mis koosneb kaheksast eksonist. Ekson 1 on mittekodeeriv.

WFS1 geen transkribeerib 3,6 kb mRNAd, mis kodeerib endoplasmaatilise retiikulumi (ER) membraan-seoselist wolframiini valku (Takeda, jt., 2001). Wolframiin on hüdrofoobne ja tetrameerne valk, mis koosneb kolmest struktuuralsest domäänist. Esiteks N-terminaalne ekstratsellulaarne hüdrofiilne regioon, kus on ligi 300 aminohapet. Teiseks oluliseks domääniks on tsentraalne hüdrofoobne osa, kus asub üheksa helikaalset transmembraanset segmenti ligi 350 aminohappe pikkusena. Kolmandaks domääniks on C-terminaalne tsütoplasmaatiline hüdrofiilne regioon. Valgu N-terminaalne ots asub tsütoplasmas ning C-terminaalne ots ER luumenis (Joonis 2) (Hofmann, jt., 2003). Valgu lokaliseerumise tõttu ER-s eeldatakse, et wolframiin omab füsioloogilisi funktsioone membraani läbilaskvuses, sekretsioonis ja kaltsiumi homöostaasi regulatsioonis. Wolframiini valgu puhul on tegemist endoglükosidaasi ning membraani glükoproteiiniga (Takeda, jt., 2001). Erinevad mRNA uuringud on näidanud wolframiini ekspressiooni väga mitmesugustes kudedes. Valk on

ekspresseeritud kõikides rakutüüpides, sealhulgas südames, ajus, platsentas, kopsudes, maksas, neerudes ja pankreases (Inoue, jt., 1998; Strom, jt., 1998).



Joonis 2. Hüpoteetiline wolframiini valgu struktuur transmembraanse regiooni asukohaga. (Rigoli, jt., 2011)

Endoplasmaatilisel retiikulumil on palju erinevaid rolle, sealhulgas post-translatsiooniline modifikatsioon ning äsja sünteesitud valkude, nagu insuliini, kokku pakkimine. ER-i erinevate funktsioonide häirumine võib tekitada tasakaalustamatust nimetatud protsesside vahel, mis viib valesti pakitud ja ka mittepakitud valkude kuhjumiseni. Sellised takistused või valkude ületöötlus võivad tekitada endoplasmaatilise retiikulumi stressivastuse või kutsuda esile apoptoosi. Hiljuti leiti, et WFS1 omab olulist rolli negatiivsel regulatsioonil ER stressivastuse korral, kus valk takistab sekretoorsete pankrease β -rakkude surma. Rakkude surm on põhjustatud ER-i signaaliraja düsregulatsioonist (Fonseca, jt., 2010). Nimelt reguleerib WFS1 negatiivselt peamist transkriptsiooni faktorit (TF), mis osaleb ER stressivastuses, aktiveerides transkriptsiooni faktorit 6 α (ATF6 α) läbi ubikvitiin-proteasoomi raja. ATF6 α on endoplasmaatilise retiikulumi II tüüpi transmembraanne transkriptsiooni faktor (Yoshida, jt., 1998).

Zatyka ja kaasautorid leidsid oma uuringutes, et wolframiini valgu C-terminaalne domeen, mis asus ER-i lumenis, seondub Na⁺/K⁺ ATPaasi beta-1 subühiku (ATP1B1) C-terminaalse domeeniga. Naatrium/kaalium-pump asub tavaliselt plasmamembraanis, kuid valmimisel leidub seda ka põgusalt endoplasmaatilises retiikulumis. Pumba puudulikkus mõjutab tugevalt apoptoosi ja neuraalsete degeneratiivsete haiguste teket. Na⁺/K⁺ ATPaasi puudulikkust võib paljudes organites põhjustada just WFS1 geenis olevad mutatsioonid. Samuti võib kuulmise kadumine olla põhjustatud kaaliumi tsirkulatsiooni muutustest sisekõrvas. Kaaliumi taseme

muutused võivad olla tingitud wolframiini ja Na⁺/K⁺ ATPaasi b1 subühiku vähesest interaktsioonist või selle puudumisest (Zatyka, jt., 2008).

Wolframiini võimalikule rollile valgu biosünteesil, modifikatsioonil, pakkimisel ning kaltsiumi homöostaasi reguleerimisel on viidatud ka hilisemates uuringutes (Zatyka, jt., 2008; Yamaguchi, jt., 2004; Fonseca, jt., 2005; Yamada, jt., 2006; Hofmann, jt., 2006; Yurimoto, jt., 2009). Tööde tulemused näitasid, et wolframiin võib aidata hoida õiget kaltsiumi ionide taset rakus, kontrollides endoplasmaatilises retiikulumis varutud kaltsiumi ionide hulka (Takei, jt., 2006).

Aina sagedamalt on esinenud juhtumeid, kus Wolframi sündroomiga patsiendid kannatavad ägeda depressiooni ja psühhoosi all ning on nii verbaalselt kui ka füüsiliselt agressiivsed (Swift, jt., 1990; Swift, jt., 1998). Wolframi sündroomiga patsientidel on tihti täheldatud neuroloogilisi komplikatsioone ja psühhiaatrilisi haigusi. Ligi 60% Wolframi sündroomiga patsientidest kannatavad just psühhiaatriliste sümptomite all (Swift, 1990) ning WFS1 mutatsiooni kandjatel on 7-korda suurem risk sattuda haiglasse psühhiaatriliste haiguste tõttu (Swift ja Swift, 2005). Takeda ja kaasautorid leidsid oma uuringus, et rottidel on kõrge WFS1 mRNA ja valgu ekspressiooni tase limbilise süsteemi teatud aladel. Sealhulgas ka mandelkeha piirkonnas, hipokampuse CA1 regioonis ja haisteköbukestes (Takeda, jt., 2001). Erinevad neuroanatomilised uuringud näitavad, et WFS1 valgu funktsiooni puudumine võib olla seotud mitmete neuroloogiliste ja psühhiaatriliste sümptomitega WS patsientidel (Sequeira, jt., 2003). Kõik siiani läbi viidud uuringud on andnud võimaluse hüpoteesile, et WFS1 geeni mutatsioonide heterosügootsus võib etendada olulist rolli psühhiaatriliste haiguste tekkes.

1.2.2 WFS1 geeni mutatsioonid seoses skisofreeniaga

Geneetilised analüüsid on aidanud leida erinevaid mutatsioone WFS1 geenis, mis võivad oluliselt mõjutada skisofreenia teket (Tabel 2). Paljudel patsientidel esineb genoomis funktsiooni kaotuse mutatsioone nagu stop-, raaminihke ja splaissimissaidi mutatsioonid. Raaminihke mutatsioonid moodustavad ligi 40% kogu mutatsioonidest, mis WS patsientidel on leitud. Samuti esineb väga palju *missense* mutatsioone (ligi 35%) ning tuvastatud on ka deletsioone ja insertioone. *Missense* mutatsioonid lokaliseeruvad peamiselt valgu C-

terminaalses hüdrofiilses osas (Hardy, jt., 1999). Seitsme aminohappe mutatsioonid valgu C-terminaalse osa lõpus võivad väga tugevalt mõjutada fenotüüpi (Sam, jt., 2001).

Kõik WFS1 geenis tuvastatud mutatsioonid jaotuvad juhuslikult üle kogu kodeeriva järjestuse (Khanim, jt., 2001). Suurem osa teadaolevatest mutatsioonidest esineb 8. eksonis, kuid see tuleneb vastava eksoni tunduvalt suuremast alast võrreldes teiste eksonitega, kus mutatsioonid saavad tekkida (Inoue, jt., 1998; Strom, jt., 1998; Gasparin, jt., 2009; Colosimo, jt., 2003). Kõikide tuvastatud mutatsioonide puhul ei ole siiani tekkinud selget fenotüüp-genotüüp suhet ning samuti ei ole kindlaid mutatsioonide klastreid või alasid, kus neid oluliselt tihedamalt esineks. Arvatakse, et WFS1 geeni kõik funktsioonid ei ole veel tuvastatud ning seetõttu on raske hinnata mutatsioonide olulisust valgu funktsioonile ja selle bioloogilisele tähtsusele.

Tabel 2. Tabelis on välja toodud mutatsioonid, mis on leitud seoses skisofreeniaga 8. eksonis. Kõikide mutatsioonide korral on toimunud aluse asendus. (Torres, jt., 2001)

Ekson	Mutatsiooni asukoht	Mutatsioon	Asendus	Patsientide fenotüüp
E-8	935T>G	ATG>AGG	M312R	Skisofreenia
E-8	1294C>G	CTG>GTG	L432V	Skisofreenia, depressioon
E-8	1554G>A	ATG>ATA	M518I	Skisofreenia
E-8	1672C>T	CGC>TGC	R558C	Skisofreenia
E-8	2312A>G	GAC>GGC	D771G	Skisofreenia
E-8	2314C>T	CGC>TGC	R772C	Skisofreenia
E-8	2356G>A	GGC>AGC	G786S	Skisofreenia
E-8	2452C>T	CGC>TGC	R818C	Skisofreenia, bipolaarne häire
E-8	2596G>A	GAC>AAC	D866N	Skisofreenia

Töö eesmärk

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli sekveneerida WFS1 geeni 8. eksonit kodeeriv piirkond skisofreenia fenotüübiga patsientidel ja kontrollindiviididel, et leida uusi mutatsioone ja analüüsida wolframiini geeni polümorfismide sagedusi ning leida nende võimalikke seoseid skisofreenia kujunemisega.

Antud uurimustöö on osa koostööprojektist TÜ Füsioloogia Instituudi ja TÜ Psühhiaatria kliiniku vahel.

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Materjal

2.1.1 DNA proovid

Patsientide (127 mittesuguluses olevat isikut) ja kontrollindiviidide (103 mittesuguluses olevat isikut) vereproovid koguti väljaõppinud meditsiiniõe poolt TÜ psühhiaatriakliinikus. Kõikidel patsientidel oli diagnoositud skisofreenia. Diagnooside koodid vastavad Maailma Tervishoiuorganisatsiooni (WHO) Rahvusvahelisele Haiguse Klassifikatsioonile (ICD-10) ning on kinnitatud ka vastavalt Vaimsete Haiguste Diagnostilise ja Statistilise Juhendi (DSM-IV) kriteeriumitele struktureeritud diagnostilise intervjuu (*Structured Clinical Interview for DSM-IV - SCID*) abil.

Patsiendid on jagatud vastavalt diagnoosidele 8 skisofreenia haigustüübi gruppidesse: paranoidne, hebefreenne, katatoonne, diferentseerumata, residuaalne, lihtne, skisoafektiivne ja skisotüüpne häire (Tabel 3). Kõige enam esines paranoidse haigustüübiga patsiente (n=88). Uurimistöösse kaasatud patsientide keskmine esmasepisoodi vanus jäi 15 ja 27 eluaasta vahele (Tabel 3). Kontrollgrupi sooline ja ealine jaotuvus on toodud tabelis 4, kus naiste osakaal oli meeste osakaalust poole suurem ning indiviidide keskmine vanus oli 34 eluaastat.

Tabel 3. Uuringus kasutatud patsientide ealine ja sooline jaotuvus ning haigustüübid.

Haiguse tüüp	Indiviidide arv			Vanus		
	Mehed	Naised	Kokku	Vanusepiirid	Keskmine vanus	Esmasepisoodi keskmine vanus
Paranoidne	41	47	88	23-74	52,9	26
Hebefreenne	4	6	10	41-58	49,5	19
Katatoonne	4	5	9	29-68	51,2	20,7
Diferentseerumata	1	0	1	30	30	15
Residuaalne	2	0	2	65-70	67,5	23,5
Lihtne	2	4	6	27-70	47,3	18
Skisoafektiivne	5	5	10	29-71	45,7	27,4
Skisotüüpne	0	1	1	24	24	18

Tabel 4. Kontrollindiviidide ealine ja sooline jaotuvus.

	Indiviidide arv	Vanusepiirid	Keskmine vanus
Mehed	36	18-63	32,4
Naised	67	18-67	35,2
Kokku	103	18-67	34,2

2.2 Metoodika

2.2.1 Vere kogumine ja säilitamine

DNA saamiseks võeti uuritavatel veeniverd (kaks 9-milliliitrist katsutit) EDTA-ga katsutisse. Katsutid kodeeriti ning varustati kuupäevaga ja saadeti laborisse edasiseks uurimiseks. DNA eraldati täisverest standardsel soolapuhvritega eraldamise teel (Lahiri, jt., 1991) ning säilitatati TE (Tris-EDTA) lahuses. Eraldatud DNA-d hoiti kuni analüüsimiseni -80°C juures. DNA kvaliteeti ja puhtust kontrolliti NanoDrop ND-1000 spektrofotomeetriga.

2.2.2 Alleelspetsiifiline PCR

Pärast täisverest eraldamist amplifitseeriti DNA proovid polümeraasi ahelreaktsiooni (*polymerase chain reaction* - PCR) meetodiga. Iga indiviidi geenilt amplifitseeriti 8. eksonit kodeeriv piirkond. Uuritava DNA jaoks kasutatud praimerid on toodud tabelis 5.

Tabel 5. Polümeraasi-ahelreaktsioonis kasutatud praimerid

	Praimeri nimetus	Järjestus 5'-3'
Alleel-spetsiifiline PCR	WFS1hum8FO	GTGGTCAGAGGGAGGCGTG
	WFS1hum8RO	GGAGTGCAGGCTCTGCTGATTC
Sekveneerimise PCR	WFS1hum8sekvFO	CAGAGGGAGGCGTGAGATG
	WFS1hum8sekvRO	TGCAGGCTCTGCTGATTCTCAC
	WFS1hum8FI	CAGAGGATCTGGGTGCGC
	WFS1hum8RI-3	GACAGAGCTCCTCCTCGGCCGT

PCR-i reaktsioonid viidi läbi 50 µl lõppmahus. Üks reaktsioon sisaldas 28,5 µl destilleeritud vett, 10 µl 5x Phusion GC puhvrit (Thermo Scientific), 5 µl 2mM dNTP (algkonts. 0,2 mM), 2,5 µl 1µM praimerit (algkonts. 0,05 µM) (Tabel 5), 0,5 µl Phusion DNA polümeraasi (0,02 U/µL) (Thermo Scientific) ja 1 µl template DNA-d (100 ng/µl). Reaktsioonid viidi läbi

termotsükleris (GeneAmp® PCR System 2700, Applied Biosystems) kasutades alljärgnevaid parameetreid:

PCR programm

	Temperatuur (°C)	Aeg	Korduste arv
Algne denaturatsioon	98°C	30 s	
Denaturatsioon	98°C	20 s	40x
Praimerite seondumine	60°C	20 s	
Praimerite ekstensioon	72°C	1 min	
Lõpp-ekstensioon	72°C	5 min	
	5°C	hoia	

Produktid lahutati 1%-lises 3,5 µl etiidumbromiidi sisaldanud agarosgeelis geelelektroforeesil 0,5 x TBE puhvris (0,045 M Trisboraat; 0,001 M EDTA). Visualiseerimiseks kasutati 6x laadimispuhvrit (6x Loading Dye; Fermentas) ning pikkusmarkeriks oli Eco130I, 16 (Fermentas).

2.2.3 Produktide puhastamine

PCR-i produktid puhastati GeneJET PCR Purification Kit (Fermentas) abil. Puhastamise eesmärgiks on eemaldada produktidest praimerid, dNTPd, ensüümid ja muud reaktsiooniosakesed. Puhastamine viidi läbi alljärgnevalt:

- Esmalt lisati PCR produktidele 48 µl sidumispuhvrit (1:1 tuubis olnud produkti mahuga), mis denatureerib valgud ning aitab järgmises etapis DNA-l seonduda filtri membraani külge. Segati korralikult vorteksil.
- Järgnevalt viidi lahus tootja poolt lisatud tuubi, mis sisaldas filtrit. Proove tsentrifuugiti 1 min täispööretel (14 000 pööret minutis). Filtrist läbi voolanud vedelik visati ära.

- Proovidele lisati 700 µl pesupuhvrit, et pesta välja jäägid. Tsentrifugiti 1 min täispööretel ning visati läbi voolanud vedelik ära. Tühja tuubi tsentrifuugiti veel 1 min täispööretel.
- GeneJET tuubidest tõsteti filtrid ümber puhastesse 1,5-ml tuubidesse ning lisati 30 µl elueerimispuhvrit. Tsentrifugiti 1 min täispööretel.
- Lõpetuseks lasti läbi voolanud 30 µl elueerimispuhvrit teistkordselt samast filtrist läbi, et kõik DNA filtri küljest kätte saada. Tuubi tsentrifuugiti veel 1 min täispööretel.
- Puhastatud DNA säilitati -20°C juures.

2.2.4 DNA puhtuse ja kvaliteedi analüüs

Puhastatud produktide kontsentratsioon määrati NanoDrop ND-1000 spektrofotomeetriga. Spektrofotomeetri tööpõhimõte seisneb vajalikus spektri osas valguse neeldumise mõõtmises ainetest läbiminekul. Saadud tulemus väljendub OD väärtustena. Kontsentratsiooni järgi arvutati DNA ja vee kogus sekveneerimise PCR-l. Puhta DNA oodatud kontsentratsioon pidi jääma vahemikku 30-50 ng/µl, mille korral lisati PCR reaktsiooni 1 µl DNA-d. Lubatud olid ka kontsentratsioonid, mis on suuremad kui 50 ng/µl, kuna suurema kontsentratsiooniga tulemused oli samuti hilisemal analüüsil arvutiprogrammis loetavad.

2.2.5 Sekveneerimise PCR

Järgnevalt tehti proovidele sekveneerimise PCR, kus üks reaktsioon sisaldas 30-50 ng DNA kontsentratsiooni korral 1 µl DNA-d, 6,14 µl destilleeritud vett, 2 µl 5x lahjenduspuhvrit (BigDye® Terminator v1.1, v3.1 5x Sequencing Buffer) (Applied Biosystems), 0,16 µl 10 µM praimerit (Tabel 5), 0,7 µl Terminator Ready Reaction mix (BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing) (Applied Biosystems). Reaktsiooni kogumahuks oli 10 µl. Reaktsioonid viidi läbi termotsükleris (GeneAmp® PCR System 2700, Applied Biosystems) kasutades alljärgnevaid parameetreid:

PCR programm

	Temperatuur (°C)	Aeg	Korduste arv
Algne denaturatsioon	95°C	1 min	
Denaturatsioon	95°C	15 s	30x
Praimerite seondumine	52°C	10 s	
Praimerite ekstensioon	60°C	1 min	
	4°C	hoia	

2.2.6 Sadestamine

Sekveneerimise PCR-i järgselt proovid sadestati. Kõigepealt määrati kindlaks kas ja kui palju oli lahuse kogus reaktsiooni käigus vähenenud. Seejärel viidi vähenenud lahuse maht veega tagasi 10 µl-ni. Sadestamine viidi läbi alljärgnevalt:

- Proovidele lisati 2 µl sadestamissegu (1,5 M NaOAc/Dextran) ja 30 µl -20°C 96%-list piiritust, segati tugevalt vortexil ning hoiti 10 minutit -20 °C juures.
- Järgnevalt tsentrifuugiti proove 10 minutit maksimaalsetel pööretel (14 000 pööret minutis) ning eemaldati supernatant veejoa-vaakumpumba abil.
- Lisati 200 µl 70 %-list -20 °C piiritust, tsentrifuugiti 5 minutit maksimaalsetel pööretel ning eemaldati supernatant veejoa-vaakumpumba abil.
- Lisati 200 µl 70 %-list -20 °C piiritust, tsentrifuugiti 5 minutit maksimaalsetel pööretel ning eemaldati supernatant veejoa-vaakumpumba abil.
- Proove kuivatati 10 minutit toatemperatuuril või 37°C juures 5 minutit. DNA võeti üles 10 µl formamiidis ning tehti korralik vortex.
- Proove säilitati kuni sekvenaatorisse minemiseni -20 °C juures.

Järjestuse määramine teostati Eesti Biokeskuse DNA Genotüpeerimise ja Sekveneerimise tuumiklaboris, kasutades Applied Biosystems 3730 xl DNA Analyzer masinat. Saadud DNA järjestuste analüüsimiseks kasutati arvutiprogrammi ChromasPro Version 1.5 (Technelysium Pty Ltd).

2.3 Andmete statistiline analüüs

Käesolevas töös kasutati sekveneerimise tulemusel saadud polümorfismide statistiliseks analüüsiks arvutiprogrammi Haploview (Version 4.2) (Barrett, jt., 2005). Antud programmiga arvutati alleeli- ja haplotüübisagedused patsientidel ja kontrollindiviididel. Samuti kontrolliti iga arvesse võetud ühenukleotiidsel polümorfismiga (*single nucleotide polymorphism* – SNP) lookuse genotüüpide jaotuvuse vastavust Hardy-Weinbergi tasakaalule.

Alleelisageduse arvutusele patsientide ja kontrollide rühmas iga SNP-i lõikes järgnes saadud erinevuste hindamine assotsiatsioonianalüüsis. Alleelse jaotuvuse erinevuse määramiseks kasutati χ^2 testi ning tulemuste statistilist olulisust hinnati p-väärtusega.

Statistilisel analüüsil saadud tulemuste interpretatsioon sõltub olulisustõenäosusest ehk p-väärtusest (*significance probability*), mis kirjeldab tõenäosust, et tulemused on saadud juhuslikult. P-väärtuse leidmiseks kasutatatakse üldiselt olulisusnivoo (*significance level*) taset, kus $\alpha=0,05$. Antud töös loetakse samuti kõik p-väärtused, mis on võrdsed või jäävad alla 0,05 statistiliselt oluliseks tulemuseks. Siinkohal on oluline lisada, et komplekshaiguste puhul nagu skisofreenia on peetud antud taset liiga pehmeks kriteeriumiks.

Enne haplotüübianalüüsi viidi läbi SNP-de omavahelise aheldatuse analüüs LD (*linkage disequilibrium*). LD-d hinnati kõigi polümorfismide paaride vahel mõlemas uuringugrupis. Aheldatuse hindamiseks kasutati log-lineaarset mudelit ning selle väljendamiseks D' väärtust, mis on vastavalt alleelisagedustele standardiseeritud LD koefitsient D . D' väärtus hindab kahe lookuse vahelise juhusliku assotsiatsiooni hälvet (Lewontin, 1988). Kui D' on võrdne ühega, siis ei ole rekombinatsiooni toimunud.

Käesolevas töös klassifitseeriti LD analüüsi tulemused järgmiselt:

$D' > 0,9$ kaks polümorfismi on täielikult aheldunud

$D' = 0,8 - 0,9$ polümorfismid on aheldunud

LD analüüs aitas leida geenisiseseid aheldunud piirkondi, et viia läbi edasine haplotüübianalüüs. Haplotüübianalüüs viidi samuti läbi arvutiprogrammiga Haploview

(Versioon 4.2), kus vaadeldi levinumate haplotüüpide sageduste erinevusi patsientidel ja kontrollindiviididel. Haplotüübiefekti statistilist olulisust hinnati χ^2 p-väärtusega ja loeti oluliseks, kui p-väärtus oli väiksem või võrdne 0,05.

3. TULEMUSED JA ARUTELU

3.1 Tulemused

Käesoleva magistritöö raames sekveneeriti WFS1 geeni 8. ekson 230 indiviidil, kellest 127 olid TÜ psühhiaatriakliinikus diagnoositud skisofreenikud ning 103 olid terved individid. Töös uuriti lähemalt 44 wolframiini geeni ühenukleotiidset polümorfismi.

Algselt kaasati uurimistöösse 44-s lookuses esinenud SNP-i, millest enamus esinesid nii patsientidel kui ka tervetel indiviididel. Hilisemal analüüsil selgus, et üheteiskümne lookuse puhul ei saadud piisavalt informatiivseid andmeid, et lugeda saadud tulemusi usaldusväärseteks. Seega uuriti edasise töö käigus wolframiini geenis 33 ühenukleotiidset polümorfismi. Seetõttu võisid ka antud töös algselt käsitletud 44-st polümorfismist välja jäänud 11 SNP-i esineda vaid mõnel üksikul indiviidil.

3.1.1 Assotsiatsioonianalüüs

33 ühenukleotiidse polümorfismiga osas viidi läbi statistiline analüüs kasutades arvutiprogrammi Haploview (Versioon 4.2). Nimetatud programm võimaldab teha erinevaid populatsioonigeneetilisi uuringuid.

Esmalt uuriti lookuste genotüüpse jaotuvuse vastavust Hardy-Weinbergi (HW) tasakaalule. Selleks arvutati HW p-väärtus Haploview programmiga. HW tasakaalu vastavust uuriti ainult kontrollrühma indiviididel, kuna patsientide hulgas võibki HW tasakaal olla nihkunud. Analüüsi tulemusel leiti, et 32 SNP-i vastasid HW tasakaalule ning üks SNP 1938 T/C rs-koodiga rs1046317 ei vastanud HW tasakaalule ($p < 0,05$). Seega jäeti antud polümorfism edasistest uuringutest välja.

Järgnevalt uuriti alleelide jaotuvust patsientide ja kontrollrühma indiviidide vahel. Patsientide ja kontrollrühma võrdluses langesid alleelide sagedused enamjaolt kokku ning 31 polümorfismi puhul ei tuvastatud statistiliselt olulisi tulemusi (Tabel 6). Assotsiatsioonianalüüsil leiti üks SNP 2027 C/T, mille puhul saadi statistiliselt oluline

tulemus $p=0,0093$. Tegemist on geeni mittekodeerivas alas asuva polümorfismiga, mis esines ainult patsientidel. Siinkohal tuleb kindlasti läbi viia kordusanalüüse, et kontrollida leitud SNP-i statistiliselt olulise tulemuse usaldusväärsust, kuna tegemist võib olla ka juhusliku kõrvalekaldega.

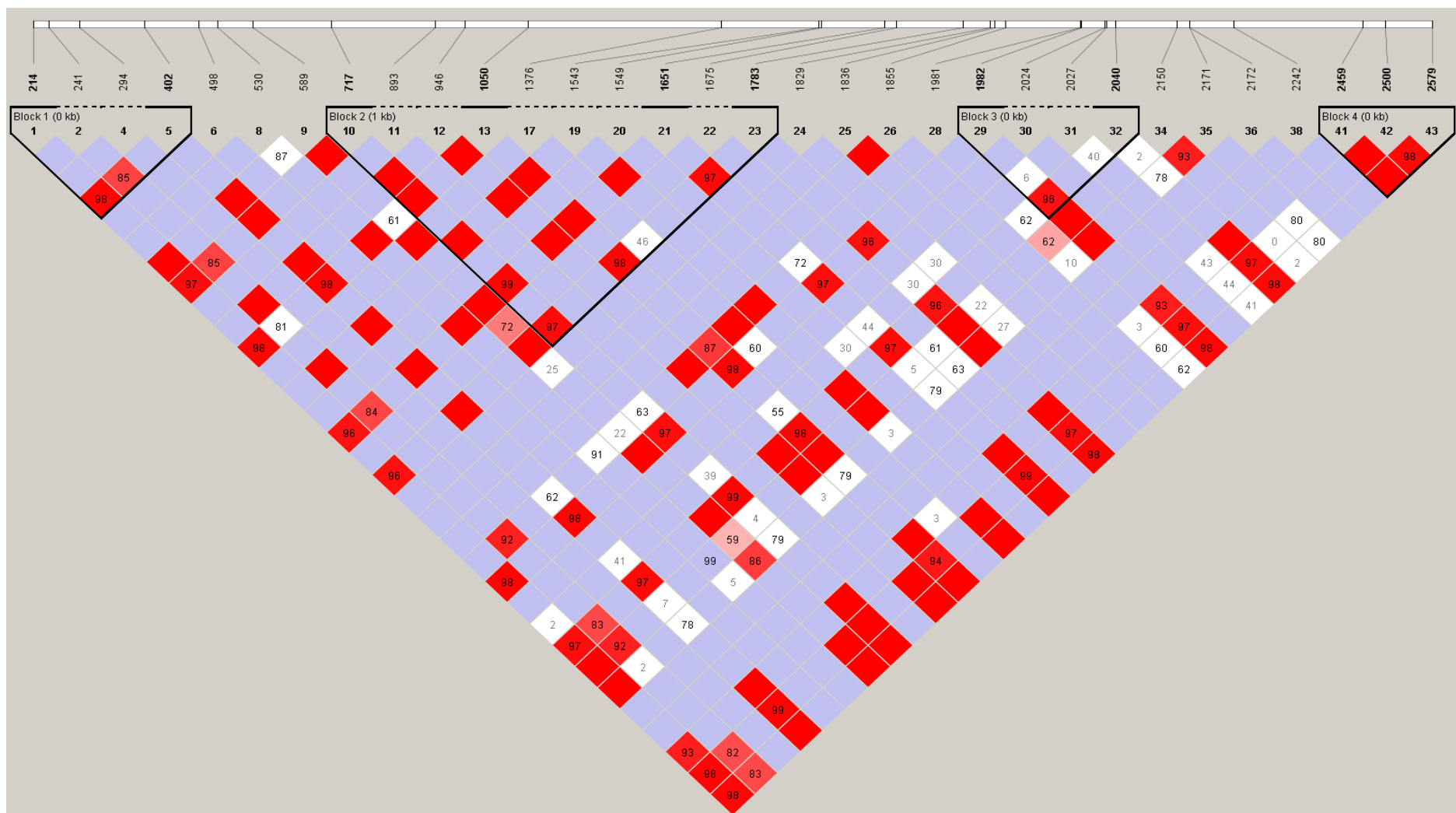
Tabel 6. Alleelisagedused ja p-väärtused patsientidel ja kontrollindiviididel. Poolpaksult on välja toodud statistiliselt olulise SNP-i andmed.

	SNP	Patsiendid	Kontrollindiviidid	P-väärtus
1	214 G/A	0,341/0,659	0,357/0.643	0.7364
2	241 C/T	0,955/0,045	0,972/0.028	0.3753
4	294 T/C	1,000/0,000	0.994/0,006	0.2392
5	402 C/T	0,410/0,590	0,460/0.540	0.3035
6	498 G/A	0,996/0,004	1,000/0.000	0.3925
8	530 C/T	0,971/0,029	0.962/0,038	0.5757
9	589 G/A	0,935/0,065	0,950/0.050	0.5141
10	717 C/T	0,411/0,589	0,440/0.560	0.5381
11	893 G/A	1,000/0,000	0.995/0,005	0.247
12	946 C/T	0,959/0,041	0,973/0.027	0.427
13	1050 G/A	0,484/0,516	0,488/0.511	0.9055
17	1376 A/G	0,984/0,016	0,990/0.010	0.5863
20	1543 G/A	0,959/0,041	0,973/0.027	0.4298
21	1549 A/T	0,988/0,012	1,000/0.000	0.1291
22	1651 G/A	0,421/0,579	0,472/0.528	0.2994
23	1675 C/T	0,996/0,004	0.9830/0,017	0.1918
24	1783 A/G	0,383/0,617	0,431/0.569	0.3288
25	1829 G/A	0,996/0,004	0.989/0,011	0.3985
26	1836 C/T	0,996/0,004	1,000/0.000	0.3879
27	1855 G/A	0,996/0,004	1,000/0.000	0.3934
29	1981 G/A	0,936/0,064	0,947/0.053	0.6545
30	1982 C/T	0,335/0,665	0,359/0.641	0.6146
31	2024 C/T	0,992/0,008	0.983/0,017	0.4162
32	2027 C/T	0,962/0,038	1,000/0.000	0.0093
33	2040 G/A	0,415/0,585	0,429/0.571	0.7756
35	2150 G/A	0,920/0,080	0,944/0.056	0.3486
36	2171 A/G	0,954/0,046	0,966/0.034	0.5237
37	2172 G/C	0,996/0,004	1,000/0.000	0.3846
39	2242 T/G	0,996/0,004	1,000/0.000	0.3827
42	2459 C/G	0,943/0,057	0.922/0,078	0.3881
43	2500 G/C	0,414/0,586	0,469/0.531	0.248
44	2579 C/T	0,410/0,590	0.459/0.541	0.3044

3.1.2 LD-analüüs

Ahelduse tasakaalustamatus (LD) on kahe (või enama) genoomse lookuse kas alleelne või genotüüpne mittejuhuslik, reeglipärane assotsiatsioon. LD-saared esinevad genoomis ebaühtlaselt ning sisaldavad haplotüübiblokke. Blokkide suurus on varieeruv sõltudes näiteks konkreetse uuringugrupi suurusest. Antud uurimustöös viidi läbi LD-analüüs, et määrata aheldusastet 32 ühenukleotiidseid polümorfisme sisaldavate lookuste vahel.

Analüüsi tulemusel tuvastati patsientide ja tervete indiviidide ühendgrupis peaaegu täieliku aheldatuse esinemine üheteistkümnel lookusel 32-st uuritavast. Esiteks leiti peaaegu täielik aheldatus SNP-de rs1801212 ja rs1801206 vahel, kus D' väärtus oli 0,9. Teiseks tuvastati peaaegu täielik aheldatus SNP-de rs1801214, rs734312, rs1046314, rs1046316 vahel, kus D' väärtus jäi vahemikku 0,97-0,99. Sama tulemus saadi ka SNP-de rs1046319 ja rs1046320 korral ($D'=0,96$) ning SNP-de rs12508118, rs9457 ja rs3200 puhul. Seega jaotusid üksteist omavahelist aheldatust näidanud lookused nelja haplotüübi blokki. Kõige pikem vahemaa kahe aheldunud lookuse vahel oli 1 Kb (Joonis 3).



Joonis 3. Töös uuritud SNP-de vaheline aheldatus. LD mustri leidmiseks ja haplotüübi blokkide visualiseerimiseks kasutati arvutiprogrammi Haploview. Joonisel on aheldunud D' väärtused näidatud punase värviga, mis on korrutatud sajaga. Haplotüübiblokkid on ümbritsetud poolpaksu musta joonega ning sulgudes on toodud äärmiste SNP-de vahelised kaugused ühes blokis.

3.1.3 Haplotüübianalüüs

LD-analüüs oli vaheetapiks enne haplotüübianalüüsi, et leida peaaegu täielikult aheldunud lookused. Haplotüübianalüüs viidi läbi arvutiprogrammiga Haploview (Versioon 4.2). Haplotüübianalüüsist jäeti välja kõik ülejäänud polümorfismid, mis ei näidanud lookustevahelist aheldatust. Samuti jäeti välja eelnevalt assotsiatsioonianalüüsis statistiliselt olulisuse tulemuse andnud SNP rs56067149, kuna antud lookuse D' väärtus oli 0,4 ning saadud tulemuse põhjal ei saa usaldusväärselt väita, et tegemist oli aheldatusega. Lähtudes LD-analüüsi tulemustest tuvastati patsientide ja tervete indiviidide ühendrühmas kolme enamlevinud haplotüübi esinemissagedused esimeses haplotüübi blokis – AT, GC, AC, mis kokku moodustasid 99,8% kõigist vaadeldud haplotüüpidest (Tabel 7).

Tabel 7. Haplotüübiblokk 1 koos enamlevinud haplotüüpide esinemissageduste ja p-väärtustega.

Haplotüübi nimetus	Blokk 1		Haplotüübi- sagedus(%)	P-väärtus
	rs1801212	rs1801206		
HT1	A	T	56,4	0.3046
HT2	G	C	34,6	0.8255
HT3	A	C	8,8	0.218

Teises blokis leiti lausa nelja SNP-i vaheline aheldatus, kus nelja enamlevinud haplotüübi – TAAG, CGGA, TGAG, CGGG esinemissagedused moodustasid 99,1 % kõigist vaadeldud haplotüüpidest. (Tabel 8.)

Tabel 8. Haplotüübiblokk 2 koos enamlevinud haplotüüpide esinemissageduste ja p-väärtustega.

Haplotüübi nimetus	Blokk 2				Haplotüübi- sagedus (%)	P- väärtus
	rs1801214	rs734312	rs1046314	rs1046316		
HT1	T	A	A	G	51,1	0.7883
HT2	C	G	G	A	38,5	0.5741
HT3	T	G	A	G	5,3	0.1854
HT4	C	G	G	G	4,2	0.886

Järgnevalt tuvastati kolmandas haplotüübiblokkis kolme enamlevinud haplotüübi – TA, CG, TG esinemissagedused, mis moodustasid 99,2 % kõigist vaadeldud haplotüüpidest. (Tabel 9.) Sarnaselt teisele blokile, leiti ka viimases ehk neljandas haplotüübi blokkis nelja enamlevinud haplotüübi esinemissagedused – CCT, CGC, GGC, CGT, mis moodustasid kõikidest vaadeldud haplotüüpidest 99,5% (Tabel 10).

Tabel 9. Haplotüübiblokk 3 koos enamlevinud haplotüüpide esinemissageduste ja p-väärtustega.

Haplotüübi nimetus	Blokk 3		Haplotüübi-sagedus (%)	P-väärtus
	rs1046319	rs1046320		
HT1	T	A	57	0.5047
HT2	C	G	33,5	0.9567
HT3	T	G	8,7	0.6438

Tabel 10. Haplotüübiblokk 4 koos enamlevinud haplotüüpide esinemissageduste ja p-väärtustega.

Haplotüübi nimetus	Blokk 4			Haplotüübi-sagedus (%)	P-väärtus
	rs12508118	rs9457	rs3200		
HT1	C	C	T	55,7	0.1709
HT2	C	G	C	36	0.6986
HT3	G	G	C	6,7	0.3869
HT4	C	G	T	1,1	0.1069

Haplotüübianalüüsi tulemusel selgus, et kõikide uuritud lookuste haplotüübisagedused patsientidel ja tervetel indiviididel ei erinenud sedavõrd, et pidada tulemusi statistiliselt oluliseks. Haplotüübiefekti hinnati χ^2 p-väärtusega, mis üleval toodud tabelites väljendub oluliselt suuremana kui 0,05 ($p > 0,05$).

Käesolevas uurimustöös tuvastati ka üks uus ühenukleotiidne polümorfism 294 T/C, mis esines ainult tervetel indiviididel. Leitud mutatsioon asub geeni kodeerivas alas, kus aminohape valiin asendubalaniiniga. Uus polümorfism vastas HW tasakaalule, kuid assotsiatsioonianalüüs ei andnud statistiliselt olulist tulemust. Samuti ei tuvastatud ka LD-

analüüsil aheldatust teiste uuritud lookustega. Uue SNP-i usaldusväärsuse kinnitamiseks ja statistiliselt olulise tulemuse saamiseks on vaja teha täiendavaid kordusanalüüse.

3.2 Arutelu

Magistritöö eesmärgiks oli vaadelda lähemalt WFS1 geenis esinevate polümorfismide võimalikke seoseid skisofreenia tekkega. Töös uuriti täpsemalt 32-s lookuses esinevat SNP-i, mille puhul ei ole eelnevalt uuritud seoseid skisofreeniaga. Küll aga on neid polümorfisme uuritud seoses teiste vaimsete haigustega.

Skisofreenia on psüühikahäire, millele on omased häired tajumises, mõtlemises, tundeelus ja tahteelus. Seoses haiguse kõrge geneetilise päritavuse tõttu (kuni 80%) on skisofreeniat viimase kümnendi jooksul ulatuslikult uuritud. Tänapäevaks on teada, et haigus on väga polügeenne ning väga erinevate geneetiliste variatsioonidega. Tänu DNA-tehnoloogia kiirele arengule on haigust uuritud erinevate analüüside kaudu, kuid siiani on kõige enam statistiliselt olulisi tulemusi andnud GWAS- ja CNV-metoodikatega läbi viidud uuringud. Teised geneetilised uuringud ei ole olnud tulemuslikud tõenäoliselt väikese valimi tõttu. GWAS metoodikas saab uurida väga mitmeid erinevaid polümorfisme üle genoomi ja seega on ka suurem võimalus leida olulisi tulemusi kiiremini.

Tegemist on komplekshaigusega, mis tähendab, et skisofreenia teket võivad mõjutada nii geneetilised kui ka keskkonnast tingitud tegurid. Seega on oluline meeles pidada, et uuringusse kaasatud üksikud geneetilised markerid ei pruugi fenotüübile olulist mõju avaldada. Küll aga on võimalus geneetilistele interaktsioonidele, mille puhul võivad mitme erineva polümorfismi interaktsioon fenotüübile olulist mõju avaldada. Komplekshaiguse puhul tuleb kindlasti arvestada ka geen-keskkond interaktsioonidega, mis tähendab, et uuringusse kaasatud patsientidel tuleks uurida ka võimalikke skisofreeniat esile kutsuvaid keskkonnategureid ja nende võimalikke seoseid genoomis leiduvate polümorfismidega. Seega võib esineda võimalus, et indiviid on täiesti terve, kuigi tema geneetika soodustab skisofreenia teket. Sel juhul võivad mängida olulist rolli keskkonnast tingitud tegurid, mis ei soodusta haiguse teket.

Tänaseks on WFS1 geenis identifitseeritud ligi 150 DNA järjestuses esinevat SNP-i, kuid siiski suur osa neist on väga haruldased ning leitud vaid mõnes üksikus populatsioonis. Antud töös võeti lähema uurimise alla WFS1 geeni 8. eksoni võimalikud seosed skisofreenia tekkega, kuna varasemalt on täheldatud geenmutatsiooni kandjatel kõrgenenud riski haigestuda psühhiaatrilistesse haigustesse. WFS1 geeni on suhteliselt palju uuritud, kuid selle seoseid konkreetset skisofreeniaga siiski vähe. Torres ja töögrupp leidsid 2001. aastal oma uuringus mitu uut polümorfismi, kuid kõikide antud mutatsioonide statistiline olulisus ei olnud piisavalt kõrge, et neid tulemusi lugeda usaldusväärseks. Põhjus võis olla näiteks uuringus kasutatud väikses valimis või juhuslikult väikese arvu oluliste polümorfismide esinemises antud populatsioonis. Vähestest uuringutest ja ebausaldusväärsetest tulemustest hoolimata arvatakse, et psühhiaatriliste haiguste seos WFS1 geeniga on olemas, mistõttu viidi läbi ka käesolev uurimustöö.

Uuringugrupis kasutatud kontrollindiviidid ja patsiendid valiti teadlikult võimalikult suure vanuse vahemikuga, kuna haigete puhul esinevad skisofreenia esmasepisoodid enamjaolt varajases täiskasvanu eas ja üle 50 % patsientidest kogevad haigusepisoodi terve elu vältel. Seega oli oluline, et mõlema uuringugrupi vanuste vahemik oleks sarnane. Kontrollrühma indiviidide hulgas oli naisi rohkem kui mehi (vastavalt 67 ja 36). Patsientide üldhulgas nii suurt meeste ja naiste hulga vahet ei olnud ning samuti oli kõikide haigustüüpide gruppides meeste ja naiste suhe enamjaolt sarnane.

Assotsiatsioonianalüüsi tulemusel leiti, et 32 lookuse genotüüpne jaotuvus vastas HW tasakaalule, kus $p^2 + 2pq + q^2 = 1$ (p ja q on antud lookuse alleelisagedused populatsioonis). Seega on alust järeldada, et uuringus kasutatud populatsioonis puudub valik ning on toimunud juhuslik ristumine.

Edasisel analüüsil leiti ühe SNP-i puhul statistiliselt oluline erinevus alleelisageduste vahel, kus $p=0,0093$, kuid ülejäänud 31 polümorfismi puhul rohkem statistiliselt olulisi erinevusi ei leitud. Tulemuseks saadud statistiliselt ebaoluliste tulemuste põhjuseid võib olla mitmeid. Esiteks on üks enam levinud üldaksepteeritud probleeme tüüp I ehk vale-positiivne viga, mille korral statistiline olulisus fenotüübi ja polümorfismi vahel tuleneb kontrollide ja patsientide juhuslikust valikust. Selle probleemi tekkimise võimalus tõuseb, kui kasutatakse väikest patsientide ja kontrollindiviidide hulka. Teiseks võib esineda vastupidine efekt ehk tüüp II viga (vale-negatiivne) viga, kus uurimustöö tulemuste õigsus sõltub samuti valimi suurusest,

kuid ka asetatud olulisuse nivoost α . Olulist rolli võib eriti komplekshaiguste puhul mängida ka heterogeensus, kus päranduv fenotüüp võib olla põhjustatud erinevatest omavahel interakteeruvatest keskkonna ja geneetilistest teguritest, mistõttu ükski testitud polümorfism ei ole piisavalt haigusega seotud. Antud töös saadud statistiliselt olulisi ja mitteolulisi tulemusi võisid mõjutada kõik eelnevalt ette loetud põhjused. Seega ei saa saadud tulemuste põhjal usaldusväärselt väita, et uuritud polümorfismid mõjutavad skisofreenia teket.

Haplotüübianalüüs koosnes uurimustöös kahest etapist, kus kõigepealt viidi läbi lookuspaaridevaheline LD analüüs ning seejärel aheldatust näidanud lookustega haplotüübianalüüs. LD analüüsi null-hüpoteesiks H_0 võeti, et üks lookus on sõltumatu teisest lookusest ning haplotüübianalüüsi null-hüpoteesiks H_0 oli, et ühe lookuse haplotüübid on sõltumatud teiste lookuste haplotüüpidest.

Uuritud 32-st lookusest andsid LD analüüsil peaaegu täieliku aheldatuse üksteist lookust ($D' \geq 0,9$), kuid paraku ei andnud ükski neist haplotüübist statistiliselt olulist efekti haiguse fenotüübile. Siinkohal võib samuti põhjuseks olla väike valim või kindla polümorfismi väike esinemissagedus populatsioonis. Seega ei näita saadud andmed tegelikult WFS1 geeni 8. eksonist välja valitud SNP-d usaldusväärset osalemist skisofreenia tekkes.

Töös avastati ka üks uus polümorfism, mis vastas HW tasakaalule, kuid statistiliselt oluliste tulemuste puudumisel jäi edasistes analüüsides tähelepanuta. Leitud uus SNP esines töös kasutatud populatsioonis ainult tervetel indiviididel. Statistiliselt ebaoluliste tulemuste saamine võib antud juhul olla tingitud väikesest patsientide ja kontrollindiviidide arvust. Samuti võib olla põhjuseks ka töös käsitletud populatsioonis antud mutatsiooni juhuslikult väike esinemissagedus. Seega tuleb uue polümorfismi usaldusväärsuse kinnitamiseks ja statistiliselt olulise tulemuse saamiseks teha täiendavaid kordusanalüüse.

Kuna magistritöö raames ei leitud väga palju statistiliselt olulisi tulemusi, siis on alust arvata, et sekveneerimisel ilmnenuid polümorfismid ei oma seoseid skisofreenia tekkega. Samal ajal tuleb nentida, et töös kasutati suhteliselt väikest arvu polümorfisme. Kuna WFS1 geenmutatsiooni kandjate sagedus sattuda haiglasse just psühhiaatriliste haiguste tõttu on tänasel päeval ikka väga suur, siis on vajalik järgnevate uuringute läbi viimine seoses WFS1 geeni teiste erinevate polümorfismide ja skisofreeniaga.

Kokkuvõte

Käesoleva magistritöö kirjanduse ülevaates käsitletakse lähemalt skisofreeniat, selle peamiseid sümptomeid ja haigustüüpe ning antakse lühiülevaade varem skisofreeniaga läbiviidud geneetilistest uuringutest. Samuti räägitakse täpsemalt Wolframi sündroomist, WFS1 geenist ja geeni poolt ekspresseeritavast wolframiini valgust. Välja on toodud ka siiani tuvastatud wolframiini valgu funktsioonid ning eelnevad WFS1 geeni uuringud seoses skisofreeniaga.

Töö praktilises osas sekveneeriti WFS1 geeni 8. eksonit kodeeriv osa 230-l indiviidil, kellest 127 olid skisofreenia diagnoosiga patsiendid ja 103 kontrollindiviidid. WFS1 geeni 8. eksonist valiti lähema vaatluse alla 33 lookust. Eesmärgiks oli leida uusi mutatsioone ja nende võimalikke seoseid skisofreenia tekkega seostatud wolframiini geeni polümorfismide ja skisofreenia kujunemise vahel. Kõigepealt teostati mõlemale uuringugrupile assotsiatsioonianalüüs, sellele järgnes vaheetapina LD analüüs 32 polümorfismiga ning lõpuks viidi läbi ka haplotüübianalüüs üheteistkümne SNP-ga.

Assotsiatsioonianalüüsil kontrolliti esmalt kõikide lookuste genotüüpse jaotuvuse vastavust Hardy-Weinbergi tasakaalule, kus vaid üks lookus tasakaalule ei vastanud. Järgnevalt teostatud alleelide esinemissageduste võrdlemisel patsientide ja kontrollindiviidide vahel leiti ühe polümorfismi 2027 C/T puhul statistiliselt oluline tulemus ($p=0,0093$). Assotsiatsioonianalüüsil võrreldi ka minoorse alleeli esinemissagedust, kuid kahe uuringugrupi vahelised sagedused olid enamasti kokkulangevad ning statistiliselt olulisi tulemusi ei saadud. LD analüüsil tuvastati 11 peaaegu täielikult aheldunud ($D' \geq 0,9$) lookust neljas haplotüübi blokis, kus kahe lookuse suurimaks vahemaaks oli 1 Kb. Järgnevalt läbi viidud haplotüübianalüüsil leiti erinevaid huvipakkuvaid haplotüüpe, kuid töös käsitletud valimi suuruse juures statistiliselt olulisi haplotüübiefekte ei suudetud näidata.

Magistritöö raames saadud tulemuste usaldusväärsuse kontrollimiseks ning rohkemate statistiliselt oluliste tulemuste saamiseks tuleb kindlasti läbi viia täiendavaid kordusanalüüse suurematel uuringugruppidel ning võimaluse korral ka erinevates populatsioonides.

Research of WFS1 gene and schizophrenia

Sirli Heinsoo

Summary

In the overview of literature of the Master's thesis the author has looked into schizophrenia, its premier symptoms and different types of the disease, also a short-overview of genetic researches, which have been made earlier with schizophrenia have been given. Likewise, Wolfram syndrome, WFS1 gene and wolframin protein expressed by gene was handled more closely. Author of the Master's thesis has brought forth functions of wolframin protein, which have identified so far and previous researches of gene WFS1 in relation to schizophrenia.

In practical part of the Master's thesis, the part which codes the eighth exon of gene WFS1 was sequenced on 230 individuals, from whom 127 were patients diagnosed with schizophrenia and 103 were controls. From the eighth exon of the gene WFS1 33 locuses were chosen for closer observation. The aim was to find new mutations and their possible connections between development of schizophrenia and polymorphisms of WFS1 gene, which has been associated with genesis of schizophrenia. At first, association analysis was made on both research groups, this was followed by LDanalysis with 32 polymorphisms as middle phase and haplotype analysis with 11 SNP was carried out at the final phase.

On association analysis, firstly conformity of the locuses division of genotype to Hardy-Weinberg equilibrium was controlled – only one locus was not conforming to the equilibrium. In subsequently accomplished comparing of allele frequency between patients and controls statistically important result ($p=0,0093$) was found in case of one polymorphism 2027 C/T. On LDanalysis 11 almost completely linkaged ($D\geq 0,9$) locuses on four blocks of haplotype, where longest distance between two locuses was 1 Kb were identified. In haplotype analysis, which was carried out subsequently, were found different interesting haplotypes, but statistically significant effects of haplotype were not able to show because of size of the sample handled in the Master's thesis.

To control reliability of the results and to get more statistically important results, it is necessary to carry out supplementary re-analyses on bigger research groups and if possible in different populations.

Tänuavaldused

Suurepärase abi, heade nõuannete ja toetuse eest käesoleva töö valmimisel soovin tänada oma juhendajat Kati Koido't ja Maarja Sadama't. Samuti tänan suure abi eest Kätlin Taimsaar't ja Aneth Tuurmaa'd. Suur tänu kõigile ülejäänud õppetooli inimestele, perele ja sõpradele, kes aitasid kaasa, toetasid ja uskusid minusse.

Kasutatud kirjandus

- Addington, A. M. and J. L. Rapoport (2009). "The genetics of childhood-onset schizophrenia: when madness strikes the prepubescent." Curr Psychiatry Rep **11**(2): 156-61.
- Aleman, A., R. S. Kahn, et al. (2003). "Sex differences in the risk of schizophrenia: evidence from meta-analysis." Arch Gen Psychiatry **60**(6): 565-71.
- American Psychiatric Association (1994). Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-IV, 4th ed. Washington (DC): American Psychiatric Association. 886 p.
- Amr, S., C. Heisey, et al. (2007). "A homozygous mutation in a novel zinc-finger protein, ERIS, is responsible for Wolfram syndrome 2." Am J Hum Genet **81**(4): 673-83.
- Athanasios, L., M. Mattingdal, et al. "Gene variants associated with schizophrenia in a Norwegian genome-wide study are replicated in a large European cohort." J Psychiatr Res **44**(12): 748-53.
- Barrett, J. C., B. Fry, et al. (2005). "Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps." Bioinformatics **21**: 263-265.
- Barrett, T. G., S. E. Bunday, et al. (1995). "Neurodegeneration and diabetes: UK nationwide study of Wolfram (DIDMOAD) syndrome." Lancet **346**(8988): 1458-63.
- Bassett, A. S., E. W. Chow, et al. (2000). "Chromosomal abnormalities and schizophrenia." Am J Med Genet **97**(1): 45-51.
- Bleuler, E. "[Dementia praecox or the group of schizophrenias]." Vertex **21**(93): 394-400.
- Bleuler, M. (1988). "[Origin and significance of Eugen Bleuler's work: 'Dementia praecox or the schizophrenia group'. A contribution to the history of Manfred Bleuler's Zurich psychiatry]." Schweiz Rundsch Med Prax **77**(48): 1322-6.
- Bresnahan, M., P. Menezes, et al. (2003). "Geographical variation in incidence, course and outcome of schizophrenia: A comparison of developing and developed countries." In: Murray, RM., PB Jones, et al., editors. "The epidemiology of schizophrenia." Cambridge: Cambridge University Press. pp. 18-33.
- Campillo Serrano, C., M. Romero, et al. (1994). "[Diagnosis and classification in psychiatric disorders]." Gac Med Mex **130**(1): 7-11.
- Cardno, A. G. and Gottesman, II (2000). "Twin studies of schizophrenia: from bow-and-arrow concordances to star wars Mx and functional genomics." Am J Med Genet **97**(1): 12-7.

- Collins, A. L., Y. Kim, et al. "Hypothesis-driven candidate genes for schizophrenia compared to genome-wide association results." Psychol Med **42**(3): 607-16.
- Colosimo, A., V. Guida, et al. (2003). "Molecular detection of novel WFS1 mutations in patients with Wolfram syndrome by a DHPLC-based assay." Hum Mutat **21**(6): 622-9.
- Ellison-Wright, I. and E. Bullmore (2009). "Meta-analysis of diffusion tensor imaging studies in schizophrenia." Schizophr Res **108**(1-3): 3-10.
- El-Shanti, H., A. C. Lidral, et al. (2000). "Homozygosity mapping identifies an additional locus for Wolfram syndrome on chromosome 4q." Am J Hum Genet **66**(4): 1229-36.
- Fonseca, S. G., M. Fukuma, et al. (2005). "WFS1 is a novel component of the unfolded protein response and maintains homeostasis of the endoplasmic reticulum in pancreatic beta-cells." J Biol Chem **280**(47): 39609-15.
- Fonseca, S. G., S. Ishigaki, et al. "Wolfram syndrome 1 gene negatively regulates ER stress signaling in rodent and human cells." J Clin Invest **120**(3): 744-55.
- Fraser, F. C. and T. Gunn (1977). "Diabetes mellitus, diabetes insipidus, and optic atrophy. An autosomal recessive syndrome?" J Med Genet **14**(3): 190-3.
- Ganie, M. A. and D. Bhat (2009). "Current developments in Wolfram syndrome." J Pediatr Endocrinol Metab **22**(1): 3-10.
- Gasparin, M. R., F. Crispim, et al. (2009). "Identification of novel mutations of the WFS1 gene in Brazilian patients with Wolfram syndrome." Eur J Endocrinol **160**(2): 309-16.
- Glahn, D., A. Reichenberg, et al. (2008). "Psychiatric neuroimaging: joining forces with epidemiology." Eur Psychiatry **23**(4): 315-9.
- Glahn, D. C., A. R. Laird, et al. (2008). "Meta-analysis of gray matter anomalies in schizophrenia: application of anatomic likelihood estimation and network analysis." Biol Psychiatry **64**(9): 774-81.
- Glahn, F., W. Schmidt-Heck, et al. (2008). "Cadmium, cobalt and lead cause stress response, cell cycle deregulation and increased steroid as well as xenobiotic metabolism in primary normal human bronchial epithelial cells which is coordinated by at least nine transcription factors." Arch Toxicol **82**(8): 513-24.
- Gunn, T., R. Bortolussi, et al. (1976). "Juvenile diabetes mellitus, optic atrophy, sensory nerve deafness, and diabetes insipidus--a syndrome." J Pediatr **89**(4): 565-70.
- Hapmap Project (2003). "The international HapMap Project." 426: 789-96.
- Hardy, C., F. Khamis, et al. (1999). "Clinical and molecular genetic analysis of 19 Wolfram syndrome kindreds demonstrating a wide spectrum of mutations in WFS1." Am J Hum Genet **65**(5): 1279-90.

- Hofmann, S. and M. F. Bauer (2006). "Wolfram syndrome-associated mutations lead to instability and proteasomal degradation of wolframin." FEBS Lett **580**(16): 4000-4.
- Hofmann, S., C. Philbrook, et al. (2003). "Wolfram syndrome: structural and functional analyses of mutant and wild-type wolframin, the WFS1 gene product." Hum Mol Genet **12**(16): 2003-12.
- Inoue, H., Y. Tanizawa, et al. (1998). "A gene encoding a transmembrane protein is mutated in patients with diabetes mellitus and optic atrophy (Wolfram syndrome)." Nat Genet **20**(2): 143-8.
- Insel, T. R. "Rethinking schizophrenia." Nature **468**(7321): 187-93.
- Jablensky, A., N. Sartorius, et al. (1992). "Schizophrenia: manifestations, incidence and course in different cultures. A World Health Organization ten-country study." Psychol Med Monogr Suppl **20**: 1-97.
- Kendler, K. S. and M. T. Tsuang (1981). "Nosology of paranoid schizophrenia and other paranoid psychoses." Schizophr Bull **7**(4): 594-610.
- Keshavan, M. S., R. Tandon, et al. (2008). "Schizophrenia, "just the facts": what we know in 2008 Part 3: neurobiology." Schizophr Res **106**(2-3): 89-107.
- Khanim, F., J. Kirk, et al. (2001). "WFS1/wolframin mutations, Wolfram syndrome, and associated diseases." Hum Mutat **17**(5): 357-67.
- Khashan, A. S., K. M. Abel, et al. (2008). "Higher risk of offspring schizophrenia following antenatal maternal exposure to severe adverse life events." Arch Gen Psychiatry **65**(2): 146-52.
- Kim, Y., S. Zerwas, et al. "Schizophrenia genetics: where next?" Schizophr Bull **37**(3): 456-63.
- Kinsley, B. T., M. Swift, et al. (1995). "Morbidity and mortality in the Wolfram syndrome." Diabetes Care **18**(12): 1566-70.
- Lahiri, D. K. and J. I Nurnberger, Jr (1991). "A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies." Nucleic Acids Research **19**(19): 5444.
- Lencz, T., T. V. Morgan, et al. (2007). "Converging evidence for a pseudoautosomal cytokine receptor gene locus in schizophrenia." Mol Psychiatry **12**(6): 572-80.
- Levinson, D. F., J. Duan, et al. "Copy number variants in schizophrenia: confirmation of five previous findings and new evidence for 3q29 microdeletions and VIPR2 duplications." Am J Psychiatry **168**(3): 302-16.

- Levinson, D. F., J. Duan, et al. "Copy number variants in schizophrenia: confirmation of five previous findings and new evidence for 3q29 microdeletions and VIPR2 duplications." Am J Psychiatry **168**(3): 302-16.
- Lewontin, R. C. (1988). "On measures of gametic disequilibrium." Genetics (120): 849-852.
- Lichtenstein, P., C. Bjork, et al. (2006). "Recurrence risks for schizophrenia in a Swedish national cohort." Psychol Med **36**(10): 1417-25.
- Lichtenstein, P., B. H. Yip, et al. (2009). "Common genetic determinants of schizophrenia and bipolar disorder in Swedish families: a population-based study." Lancet **373**(9659): 234-9.
- McGrath, J., S. Saha, et al. (2008). "Schizophrenia: a concise overview of incidence, prevalence, and mortality." Epidemiol Rev **30**: 67-76.
- McGuffin, P. and P. Huckle (1990). "Simulation of Mendelism revisited: the recessive gene for attending medical school." Am J Hum Genet **46**(5): 994-9.
- Murray, C. J. and A. D. Lopez (1996). "Evidence-based health policy--lessons from the Global Burden of Disease Study." Science **274**(5288): 740-3.
- Need, A. C., D. Ge, et al. (2009). "A genome-wide investigation of SNPs and CNVs in schizophrenia." PLoS Genet **5**(2): e1000373.
- Ng, M. Y., D. F. Levinson, et al. (2009). "Meta-analysis of 32 genome-wide linkage studies of schizophrenia." Mol Psychiatry **14**(8): 774-85.
- O'Donovan, M. C., N. Craddock, et al. (2008). "Identification of loci associated with schizophrenia by genome-wide association and follow-up." Nat Genet **40**(9): 1053-5.
- Purcell, S. M., N. R. Wray, et al. (2009). "Common polygenic variation contributes to risk of schizophrenia and bipolar disorder." Nature **460**(7256): 748-52.
- Richards, A. L., L. Jones, et al. "Schizophrenia susceptibility alleles are enriched for alleles that affect gene expression in adult human brain." Mol Psychiatry **17**(2): 193-201.
- Rigoli, L., F. Lombardo, et al. "Wolfram syndrome and WFS1 gene." Clin Genet **79**(2): 103-17.
- Saha, S., D. Chant, et al. (2005). "A systematic review of the prevalence of schizophrenia." PLoS Med **2**(5): e141.
- Sam, W., H. Qin, et al. (2001). "Homozygosity for a 4-bp deletion in a patient with Wolfram syndrome suggesting possible phenotype and genotype correlation." Clin Genet **59**(2): 136-8.

- Sanders, A. R., J. Duan, et al. (2008). "No significant association of 14 candidate genes with schizophrenia in a large European ancestry sample: implications for psychiatric genetics." Am J Psychiatry **165**(4): 497-506.
- Sebat, J., D. L. Levy, et al. (2009). "Rare structural variants in schizophrenia: one disorder, multiple mutations; one mutation, multiple disorders." Trends Genet **25**(12): 528-35.
- Sequeira, A., C. Kim, et al. (2003). "Wolfram syndrome and suicide: Evidence for a role of WFS1 in suicidal and impulsive behavior." Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet **119B**(1): 108-13.
- Shi, J., D. F. Levinson, et al. (2009). "Common variants on chromosome 6p22.1 are associated with schizophrenia." Nature **460**(7256): 753-7.
- Stefansson, H., R. A. Ophoff, et al. (2009). "Common variants conferring risk of schizophrenia." Nature **460**(7256): 744-7.
- Strom, T. M., K. Hortnagel, et al. (1998). "Diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy and deafness (DIDMOAD) caused by mutations in a novel gene (wolframin) coding for a predicted transmembrane protein." Hum Mol Genet **7**(13): 2021-8.
- Sullivan, P. F. (2005). "The genetics of schizophrenia." PLoS Med **2**(7): e212.
- Sullivan, P. F., K. S. Kendler, et al. (2003). "Schizophrenia as a complex trait: evidence from a meta-analysis of twin studies." Arch Gen Psychiatry **60**(12): 1187-92.
- Sullivan, P. F., D. Lin, et al. (2008). "Genomewide association for schizophrenia in the CATIE study: results of stage 1." Mol Psychiatry **13**(6): 570-84.
- Swift, M. and R. G. Swift (2005). "Wolframin mutations and hospitalization for psychiatric illness." Mol Psychiatry **10**(8): 799-803.
- Swift, R. G., M. H. Polymeropoulos, et al. (1998). "Predisposition of Wolfram syndrome heterozygotes to psychiatric illness." Mol Psychiatry **3**(1): 86-91.
- Swift, R. G., D. B. Sadler, et al. (1990). "Psychiatric findings in Wolfram syndrome homozygotes." Lancet **336**(8716): 667-9.
- Zatyka, M., C. Ricketts, et al. (2008). "Sodium-potassium ATPase 1 subunit is a molecular partner of Wolframin, an endoplasmic reticulum protein involved in ER stress." Hum Mol Genet **17**(2): 190-200.
- Takeda, K., H. Inoue, et al. (2001). "WFS1 (Wolfram syndrome 1) gene product: predominant subcellular localization to endoplasmic reticulum in cultured cells and neuronal expression in rat brain." Hum Mol Genet **10**(5): 477-84.
- Takei, D., H. Ishihara, et al. (2006). "WFS1 protein modulates the free Ca²⁺ concentration in the endoplasmic reticulum." FEBS Lett **580**(24): 5635-40.

- Tandon, R., M. S. Keshavan, et al. (2008). "Schizophrenia, "just the facts" what we know in 2008. 2. Epidemiology and etiology." Schizophr Res **102**(1-3): 1-18.
- Tandon, R., M. S. Keshavan, et al. (2008). "Schizophrenia, "Just the Facts": what we know in 2008 part 1: overview." Schizophr Res **100**(1-3): 4-19.
- Tandon, R., H. A. Nasrallah, et al. (2009). "Schizophrenia, "just the facts" 4. Clinical features and conceptualization." Schizophr Res **110**(1-3): 1-23.
- Torres, R., E. Leroy, et al. (2001). "Mutation screening of the Wolfram syndrome gene in psychiatric patients." Mol Psychiatry **6**(1): 39-43.
- van Os, J. and S. Kapur (2009). "Schizophrenia." Lancet **374**(9690): 635-45.
- Vita, A., L. De Peri, et al. (2006). "Brain morphology in first-episode schizophrenia: a meta-analysis of quantitative magnetic resonance imaging studies." Schizophr Res **82**: 75–88.
- Wolfram, DJ., HP. Wagener (1938). "Diabetes mellitus and simple optic atrophy among siblings: report of four cases." Mayo Clin Proc **13**: 715–718.
- Wray, N. R. and P. M. Visscher "Narrowing the boundaries of the genetic architecture of schizophrenia." Schizophr Bull **36**(1): 14-23.
- Yamada, T., H. Ishihara, et al. (2006). "WFS1-deficiency increases endoplasmic reticulum stress, impairs cell cycle progression and triggers the apoptotic pathway specifically in pancreatic beta-cells." Hum Mol Genet **15**(10): 1600-9.
- Yamaguchi, S., H. Ishihara, et al. (2004). "Endoplasmic reticulum stress and N-glycosylation modulate expression of WFS1 protein." Biochem Biophys Res Commun **325**(1): 250-6.
- Yoshida, H., K. Haze, et al. (1998). "Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors." J Biol Chem **273**(50): 33741-9.
- Yurimoto, S., N. Hatano, et al. (2009). "Identification and characterization of wolframin, the product of the wolfram syndrome gene (WFS1), as a novel calmodulin-binding protein." Biochemistry **48**(18): 3946-55.

Kasutatud veebiaadressid

<http://www.kliinikum.ee/psychhiaatrikliinik/lisad/ravi/ph/20psychhoos.htm>

Kasutatud raamatud

Weinberger, D. R. Ja Harrison, P. J. 2011. "Schizophrenia" 3rd edition.

Lönnqvist, J., Heikkinen, M., jt. 1999. "Psühhiaatria" tõlgitud teosest "Psykiatria". Medicina

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina _____ Sirli Heinsoo _____
(*autori nimi*)
(sünnikuupäev: _____ 08.02.1990 _____)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

„WFS1 geeni uurimine seoses skisofreeniaga“,
(*lõputöö pealkiri*)

mille juhendaja on Kati Koido,

(*juhendaja nimi*)

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, _____ 27.05.2013 _____ (*kuupäev*)